

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DJILLALI LIABES
FACULTE DES SCIENCES
DE LA NATURE ET DE LA VIE
SIDI BEL ABBES



LABORATOIRE DES MICROORGANISMES BENEFIQUES,
DES ALIMENTS FONCTIONNELS ET DE LA SANTE
LABORATOIRE DE BIOTOXICOLOGIE

THESE
DE DOCTORAT de TROISIEME CYCLE

Présentée par : **Melle YAHLA Imène**

Spécialité : **Sciences biologiques**

Option : **Immunochimie alimentaire et santé**

Intitulé

*Effets anti-obésité et anti-inflammatoires de certaines
bactéries probiotiques associées ou non aux isomères
conjugués de l'acide linoléique*

Soutenue en 2017

Devant le jury composé de :

Président :	Pr. Benali Mohamed	Univ. Sidi-Bel-Abbès
Examineurs :	Pr. Dilmi Bouras Abdelkader	Univ. Chlef
	Pr. Abouni Bouziane	Univ. Sidi-Bel-Abbès
Rapporteur :	Pr. Riazi Ali	Univ. Mostaganem

AVANT- PROPOS

La plus grande partie de cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem. L'analyse qualitative et quantitative des CLA a été faite à l'unité de recherche UMR1289 sur les Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme (Université de Toulouse, INPT ENVT, F-31076 Toulouse, France).

Je tiens, tout d'abord, à témoigner ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse, Mr. Riazi Ali, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour m'avoir acceptée dans son laboratoire, initiée à la recherche, et pour avoir consacré tout son temps et ses moyens à la bonne conduite de ce travail. Soyez rassuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Mes chaleureux et respectueux remerciements adressés à Mr. Benali Mohamed, Professeur à l'université de Sidi Bel Abbes de m'avoir initiée en doctorat, acceptée au niveau de son laboratoire (Laboratoire de Biotoxicologie) de l'université Djillali Liabes à Sidi Bel Abbes et qui a bien voulu présider le jury de ma thèse.

Je remercie également Mr. Dilmi Bouras Abdelkader, Professeur à l'université Hassiba Ben Bouali de Chlef pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie Mr. Abbouni Bouziane, Professeur à l'université Djillali Liabes de Sidi Bel Abbes d'avoir aimablement accepté d'apporter ses critiques à ce travail.

Je tiens à remercier également le Pr. Francis Enjalbert (Dircteur de recherche à l'Université de Toulouse, INPT ENVT, UMR1289 Tissus Animaux Nutrition Digestion Ecosystème et Métabolisme, F-31076 Toulouse, France) pour avoir accepté de m'accueillir dans son équipe, mis à ma disposition les moyens pour réaliser la qualification et la quantification des CLA.

Je voudrais également remercier Mr. Yves Farizon, responsable du Laboratoire d'Analyses Chimiques, Unité d'Alimentation UMR INRA-INP/ENSAT- ENVT pour ses conseils pratiques et son suivi pour la préparation des échantillons des isomères conjugués de l'acide linoléique et leur analyse CPG-FID.

Je salue et remercie mes enseignants et collègues de l'équipe du laboratoire LMBAFS, ainsi que l'ingénieure du laboratoire, Mme Latifa Bendjermikh, pour leurs encouragements et leurs conseils.

Enfin, un immense merci à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation.

Mostaganem, Février 2017

ImèneYahla

RESUME

Le syndrome métabolique est un trouble physiologique complexe et multifactoriel qui contribue à l'augmentation du risque cardiovasculaire et du diabète de type 2. L'obésité est devenue un facteur de risque important dans la survenance de ce syndrome et son traitement est devenu la priorité des acteurs de la santé de nombreux pays. L'obésité est souvent associée à un état inflammatoire chronique dû à la sédentarisation couplée à la malbouffe. Plusieurs observations cliniques ont montré qu'une bonne hygiène de vie (activité physique et alimentation saine) représente une stratégie efficace pour combattre l'obésité et ses complications. Parmi les moyens de lutte contre ce fléau, les bactéries probiotiques associées aux isomères bactériens de l'acide linoléique (CLA pour Conjugated Linoleic Acid) semblent attirer l'attention des chercheurs pour être utilisés comme anti-obésité et anti-inflammatoire. Cette étude a pour objectif principal, la détermination des effets bénéfiques des CLA produits par deux bactéries probiotiques : *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12. Ces bactéries ont été testées pour leur pouvoir de bioconversion de l'acide linoléique en ses isomères conjugués (CLA) *in vitro* et *in vivo* chez des rats mâles Wistar à obésité nutri-induite par un régime Hyper-Gras. Le but étant d'explorer les effets des CLA produits sur l'obésité et sur l'état inflammatoire qui lui est associée, les rats recevaient une dose quotidienne de souches étudiées séparément supplémentées de 1.4% d'acide linoléique. Les résultats obtenus ont révélé que les deux souches sont capables de produire des isomères de CLA *in vitro* et *in vivo* qui ont des effets anti-obésité, anti-oxydant et anti-inflammatoire.

Mots clés : Probiotiques- Acide Linoléique Conjugué- Bioconversion- Obésité- Inflammation- Stress oxydatif.

ABSTRACT

Metabolic syndrome is a complex and multifactorial physiological disorder that contributes to increased cardiovascular risk and type 2 diabetes. Obesity has become a major risk factor in the occurrence of this syndrome and much concern is now given to its treatment by health workers of many countries. Obesity is often associated with a chronic inflammatory state due to sedentariness and malnutrition. Several clinical investigations have reported that the adoption of healthy life (physical exercises and healthy nutrition) was an efficient strategy against complications linked to obesity. Much attention was given by scientists to the association of probiotic bacteria and isomers of conjugated linoleic acid (CLA) in order to be used as anti-obesity and anti-inflammatory supplement. The main objective of this study is to determine the beneficial effects of CLA produced by probiotic bacteria. These strains include *Lactobacillus rhamnosus* LIBRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12, which were first explored for their ability to bioconvert linoleic acid to its conjugated isomers (CLA) *in Vitro* and *in Vivo* using a five-week-old male Wistar rats fed high-fat diet . Aiming to explore the effects of produced CLA on obesity and associated inflammatory state, rats received a daily dose of studied strains separately supplemented with 1.4% of linoleic acid. Obtained results revealed that both, the two strains were able to produce CLA isomers *in Vitro* and *in Vivo* having an anti-obesity, anti-oxidant and anti-inflammatory effects.

Key-words: Probiotics- Conjugated- Linoleic Acid- Bioconversion- Obesity- Inflammation- Oxydative Stress.

ملخص

متلازمة الأيض هي عبارة عن اضطرابات فسيولوجية معقدة و متعددة العوامل تساهم في زيادة مخاطر القلب والأوعية الدموية وداء السكري من النوع 2. أصبحت السمنة عامل خطر مهم في حدوث هذه المتلازمة وعلاجه أصبح أولوية فاعلة في الرعاية الصحية في العديد من البلدان ، بسبب نمط الحياة المستقرة مع اتباع نظام غذائي غير صحي والسمنة وكثيرا ما يرتبط مع الالتهاب المزمن. العديد من الملاحظات السريرية أظهرت أن تغيير نمط الحياة ، بما في ذلك اعتماد طريقة تناول الطعام الصحي، استراتيجية فعالة لمكافحة السمنة ومضاعفاتها.من بين طرق محاربة هذه الآفة جذب انتباه الباحثين استخدام بكتيريا البروبيوتيك المرتبطة بنظائر حمض اللينوليك لمكافحة السمنة و للالتهابات. يتعلق الامر بالسلاسل البكتيرية اللبنية و التي استعملت لتحديد امكانياتها لتحويل حمض اللينوليك الى نظائره في المختبر. ثم التأكد من حفظ هذه الخاصية تم في الجسم الحي. في الجسم الحي التجارب أجريت على جرذان ويستار ذكور تتراوح أعمارهم بين خمسة أسابيع كانت السمنة ناجمة عن حمية فرط الدهون. والهدف من ذلك هو استكشاف آثار نظائر حمض اللينوليك المنتجات في السمنة والالتهاب الذي يرتبط معها, الفئران تلقت جرعة يومية من درس سلاسل منفصلة في 1.4% من حمض اللينوليك. النتائج التي تم الحصول عليها كشفت أن اثنين من سلاسل قادرة على إنتاج اثر حمض اللينوليك الذين أظهروا قوتهم في مكافحة السمنة ،كمواد مضادة للتأكسد لمضادة للالتهابات.

.الكلمات الرئيسية : البروبيوتيك, نظائر أحماض اللينوليك, تحويل, السمنة, التهاب, الإجهاد التأكسدي

Liste des Abréviations

- AG: Acide Gras.
- ALB : Albumine.
- Bb12: *Bifidocaterium animalis* subsp *lactis*.
- Bb12-LA : *Bifidocaterium animalis* subsp *lactis* associée à l'acide linoléique.
- EGIR : European Group of Insulin Resistance ou groupe européen d'étude sur l'insulinorésistance
- ELISA : dosage immuno-enzymatique
- C : acide gras de configuration *cis*.
- CLA: Acide Linoléique Conjugué (Conjugated Linoleic Acid).
- CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.
- CT : cholestérol total.
- CRP : C-reactive protein ou protéine C-Réactive
- DS : Dilution Simple.
- ERO : Espèces Réactives Oxygénées
- H&E : Hématoxyline- Eosine.
- HFHS : High Fat High Sucrose ou Régime Hyper Gras Hyper Sucrose
- HDL : High Density Lipoprotein ou lipoprotéine de haute densité
- Ig : Immunoglobuline.
- IL : Interleukine.
- IMC : Indice de Masse Corporelle.
- LA : Linoleic Acid ou acide linoléique
- LBRE-LSAS : *Lactobacillus rhamnosus* Expérimentale.
- LBRE-LSAS-LA : *Lactobacillus rhamnosus* Expérimentale associée à l'acide linoléique.
- MAT : Mesenteric Adipose Tissue ou tissu adipeux mésentérique
- NAFLD : Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ou stéatose hépatique non alcoolique
- OMS : Organisation Mondiale de la Santé.
- PA : Pression Artérielle.
- PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1 ou Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1
- PBS : Phosphate Buffer saline ou tampon phosphate salin

- PG : Prostaglandines.
- PPAR : Peroxisome Proliferator Activated Receptors ou récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes
- PT : Protéines Totales.
- LDL : Low Density Lipoprotein ou lipoprotéine de basse densité
- LPS : Lipopolysaccharides.
- MDA : Malonaldehyde.
- MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales.
- MRS : De Man, Rogosa et Sharpe (milieu spécifique pour les lactobacilles)
- RHG : Régime Hyper-Gras ou HFD : High-Fat Diet.
- RS : régime standard.
- SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
- SGI : Système Gastro- Intestinal.
- SII : Syndrome de l'Intestin Irritable
- SOD: Superoxyde Dismutase.
- T : Acide Gras de configuration *trans*.
- TA : Tissu Adipeux
- TG : Triglycérides
- TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha ou facteur de nécrose tumorale alpha
- U : unité enzymatique.
- VLDL : Very Low Density Lipoprotein ou Lipoprotéine de très basse densité
- WAT : White Adipose Tissue ou tissu adipeux blanc

Liste des tableaux et des figures

Liste des tableaux

CHAPITRE I : Syndrome métabolique, probiotiques et acides linoléiques conjugués

<u>Tableau 1:</u> Définition du syndrome métabolique selon l'organisation mondiale de la santé (OMS,1998)	6
<u>Tableau 2:</u> Critères du syndrome métabolique selon le National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) (2001)	7
<u>Tableau 3:</u> Définition du syndrome métabolique selon le groupe EGIR (European group for the study of insulin resistance) (Schlienger et Monnier, 2016).....	7
<u>Tableau 4:</u> Définition du syndrome métabolique proposée par l'American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) (Schlienger et Monnier,2016).....	8
<u>Tableau 5:</u> Définition du syndrome métabolique de l'International Diabetes Federation (IDF/FID) (Schlienger et Monnier, 2016).....	8
<u>Tableau 6:</u> Tentative d'harmonisation des critères du syndrome métabolique (Schlienger et Monnier, 2016).....	9
<u>Tableau 7:</u> Classification selon le poids, l'IMC et le niveau de risque de morbidité associé (Vatier et al., 2014).....	12
<u>Tableau 8:</u> Fonctions, origines cellulaires et régulation des principales Adipokines au cours de l'obésité (Badimon et al., 2015).....	18
<u>Tableau 9:</u> Principales souches probiotiques (Faure et al., 2013).....	20
<u>Tableau 10:</u> Exemples de produits commerciaux probiotiques (Barry et al., 2015)	21
<u>Tableau 11:</u> Contenu en CLA de divers aliments (Koba et Yanagita, 2014).....	31

CHAPITRE II: Bioconversion de l'acide linoléique par des souches probiotiques in vitro.

Tableau 12: Activité acidifiante des souches testées exprimée en termes de Ph
après 24h d'incubation à 37C° sur MRS en présence ou en absence d'acide
linoléique (LA) 51

Tableau 13: Production bactérienne de CLA (mg/mL) in vitro après 24h
d'incubation à 37C° sur milieu MRS additionné de 0.5mg/mL d'acide linoléique.. 54

**CHAPITRE III : Effets des Isomères Bactériens de L'Acide Linoléique
Conjugué (CLA) chez des Rats Wistar à Obésité Nutri-Induite par un
Régime Hyper-Gras**

Tableau 14 : Mise en lots, régimes et traitement des rats de l'expérience..... 60

Tableau 15 : Composition des régimes utilisés dans l'expérimentation..... 60

Tableau 16: Production bactérienne de CLA (mg/mL) in vitro après 24h
d'incubation à 37°C sur milieu MRS additionné de 0.5mg/ mL d'acide linoléique. 66

Tableau 17: Paramètres biochimiques plasmatiques des lots expérimentaux..... 70

**CHAPITRE IV : Effets des Isomères Bactériens de l'Acide Linoléique
Conjugué(CLA) sur les Tissus Hépatique et Adipeux des Rats à Obésité
Nutri-Induite.**

Tableau 18: Teneurs en Triglycérides (TG*) et en Cholestérol Total (CT*)
hépatique (mM/g)..... 77

Tableau 19: Teneurs en Triglycérides (TG*) et en Cholestérol Total (CT*) du
tissu adipeux (mM/g)..... 81

Liste des figures

**CHAPITRE I: Syndrome métabolique, probiotiques et acide linoléique
conjugué**

Figure 1: Facteurs impliqués dans le développement de l'obésité (Faucher et
Poitou, 2015)..... 13

Figure 2 : Caractéristiques des souches probiotiques (Butel, 2014)..... 19

Figure 3 : Mécanismes d'action des probiotiques (Mizock et al., 2015).....	22
Figure 4 : Structure des isomères cis-9, trans-11 (CLA) et trans-10, cis-12 (CLA), les deux principaux isomères de l'acide linoléique (Shen et McIntosh, 2016).....	30
Figure 5 : Biohydrogénation de l'acide linoléique et l'acide linoléique dans le rumen (Van Nieuwenhove et al., 2012).....	32
Figure 6 : Bioconversion de l'acide linoléique par les les bactéries lactiques (Vela Gurovic et al., 2014).....	33
CHAPITRE II : Bioconversion de l'acide linoléique par des souches probiotiques in vitro.	
Figure 7 : Biomasse accumulée (log UFC/mL) après 24h de monoculture à 37C° en anaérobiose de <i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS et <i>B. lactis</i> Bb12 sur milieu MRS additionné de 0.5mg/mL d'acide linoléique.....	51
CHAPITRE III : Effet anti- obésité des CLA bactériens sur des rats nourris d'un régime hyper gras.	
Figure 8: Implantation de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS et de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp lactis Bb12 (exprimée en termes de population viable en log UFC/mL) dans le tube digestif de rats Wistar à obésité nutri-induite et gavés 96h avec 109 UFC de l'une ou l'autre de ces souches. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm écart type (n = 3).....	63
Figure 9 : Effet « souches » (9A) ou « souches+ acide linoléique » (9B) sur le gain de poids (en %) des rats à obésité nutri-induite (HFD) comparés aux rats témoins (9C)...	67
Figure 10: Effet « régime HFD », « HFD+souche », « HFD+ acide linoléique » ou « HFD+ souche+acide linoléique » sur le poids (en g) du tissu adipeux blanc (A), du tissu adipeux mésentérique (B), des reins (C) et de la rate par rapport au régime témoin (SD après 8 semaines d'expérimentation.....	68
CHAPITRE III : Effets des Isomères Bactériens de L'Acide Linoléique Conjugué (CLA) chez des Rats Wistar à Obésité Nutri-Induite par un Régime Hyper-Gras	
Figure 11: Observation microscopique des coupes (5 μ m) histologiques (x100) du foie de rats Wistar mâles nourris avec un régime standard (A) ou un régime hyper-gras ou HFD (B) sans souches bactériennes ni acide linoléique ; ou encore avec un régime hyper-gras(HFD) avec <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS+ acide linoléique (C) ou <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp lactis Bb12+ acide linoléique (D).....	79
Figure 12: Observation microscopique des coupes (5 μ m) histologiques (x100) du	

tissu adipeux de rats mâles nourris avec un régime standard (A) ou un régime hyper-gras ou HFD (B) sans souches bactériennes ni acide linoléique ; ou encore avec un régime hyper-gras(HFD) avec *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS+ acide linoléique (C) ou *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12+ acide linoléique (D)... 82

CHAPITRE V: Effet des CLA produits par les probiotiques sur le stress oxydatif et l'inflammation chez des rats Wistar à Obésité Nutri-Induite par un régime hyper-gras.

Figure 13: Teneurs plasmatiques en malonaldéhyde (MDA) (nM/mL) chez des rats Wistar mâles recevant un Régime Hyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS)..... 89

Figure 14: Taux d'activité de la superoxyde dismutase (SOD) (U/ cg Hb) chez des rats Wistar mâles recevant un Régime Hyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS)..... 92

Figure 15: Taux d'activité de la catalase (CAT) (U/ cg Hb) chez des rats Wistar mâles recevant un Régime Hyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS)..... 92

Figure 16: Teneurs en prostaglandines E2 (PGE2) (pg/mL) chez des rats Wistar mâles recevant un Régime Hyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS)..... 94

Figure 17: Teneurs en protéines totales (g/L) chez des rats Wistar mâles recevant un Régime Hyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS)..... 94

Figure 18: Teneurs en albumine (g/L) chez des rats Wistar mâles recevant un RégimeHyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS)..... 96

Sommaire

Avant- propos	
Résumé	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux et des figures	
Sommaire	
Introduction générale	1
Chapitre I : Syndrome métabolique, probiotiques et CLA.....	5
I.1. Le syndrome métabolique	5
I.1.1. Les différentes définitions du syndrome métabolique	5
I.1.2. Anomalies biologiques dans le syndrome métabolique.....	9
I.1.3. Obésité et inflammation.....	10
I.1.3.1. Définition et types de l'obésité.....	10
I.1.3.2. Origines Multifactorielles de l'obésité.....	12
I.1.3.3. Dysfonction du tissu adipeux associée à l'obésité.....	13
I.1.3.4. Adipocytes : Hypertrophie et hyperplasie.....	15
a. La leptine.....	16
b. L'adiponectine.....	16
c. Les autres adipokines.....	17
I.2. Les probiotiques.....	17
I.2.1. Définition des probiotiques.....	17
I.2.2. Critères de sélection des probiotiques.....	17
I.2.3. Principales souches probiotiques	19
I.2.4. Mécanismes d'action des probiotiques.....	19
I.2.4.1. Effet barrière des probiotiques	22
I.2.4.2. Effet sur le système immunitaire.....	22
I.2.4.3. Effet de la flore intestinale sur la production d'éléments essentiels et la détoxification.....	23
I.2.5. Effets de probiotiques sur la santé.....	23
a. Probiotiques et diarrhées.....	23

b. Probiotiques et MICI.....	24
c. Probiotiques et <i>Helicobacter Piloni</i>	24
d. Probiotiques et autres pathologies gastro-intestinales.....	24
e. Probiotiques et cancers gastro-intestinaux.....	25
f. Probiotiques et allergies.....	26
g. Probiotiques et immunité.....	26
h. Probiotiques et maladies hépatiques.....	27
i. Probiotiques et obésité.....	27
I.3. Acide linoléique conjugué (CLA).....	28
I.3.1. Définition.....	28
I.3.2. Source des CLA.....	29
I.3. 3. Production et synthèse des CLA.....	30
I.3.3.1. Production microbiologique	30
a. Production ruminale.....	30
b. Production des CLA par les probiotiques.....	32
I.3.3.2. Substrats alternatifs pour la production des CLA.....	33
I.3.3.3. Les CLA de synthèse chimiques.....	34
a. Méthode catalytique homogène.....	34
b. Méthode catalytique hétérogène.....	34
c. Synthèse des CLA par isomérisation biphasique avec des métaux transitionnels.....	34
d. Obtenir des CLA par méthode photochimique.....	35
I.3.4. Effets des CLA sur la santé	35
I.3 4.1. CLA et cancer.....	35
I.3.4.2. CLA et obésité.....	36
I.3.4.3. CLA et inflammation.....	36
I.3.4.4. CLA et diabète.....	37
I.3.4.5.CLA et athérosclérose.....	37
I.3.4.6. CLA et effet anti microbien.....	38
I.3..4.7. CLA et composition corporelle.....	38
I.3.4.8. CLA et croissance.....	39
I.3.5. Mécanismes d’actions	39
I.3.5.1. Actions sur le métabolisme lipidique et sur la dépense énergétique.....	39

I.3.5.2. Actions sur la différenciation et la prolifération adipocytaires.....	40
I.3.5.3. Actions sur le métabolisme glucidique et propriétés antidiabétique.....	41
CHAPITRE II : Bioconversion de L'Acide Linoléique par des Souches	
Probiotiques In Vitro.....	43
II.1. Résumé.....	43
II.2 Abstract.....	43
II.3. Introduction.....	44
II.4. Matériels et Méthodes.....	44
II.4.1. Souches, milieux de culture et réactifs.....	44
II.4.2. Culture des souches probiotiques.....	45
II.4.2.1. Repiquage et revivification.....	45
II.4.2.2. Ajustement de l'inoculum.....	45
II.4.2.3. Pouvoir fermentaire des souches bénéfiques sur milieu MRS en présence de l'acide linoléique.....	46
II.4.2.4. Détermination de la biomasse après 24h d'incubation.....	46
II.4.2.5. Mesure de pH.....	46
II.4.3. Détermination des CLA issus de la conversion bactérienne de l'acide Linoéique.....	46
II.4.3.1. Extraction et méthylation	47
II.4.3.1.1. Extraction-méthylation des acides gras (Jenkins, 2010).....	47
II.4.3.1.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse.....	48
II.4.4. Traitement statistique des résultats.....	48
II.5. Résultats et discussion.....	48
II.5.1. Pouvoir fermentaire des souches bénéfiques sur milieu MRS en présence d'acide linoléique.....	48
II.5.1.1. Biomasse accumulée.....	48
II.5.1.2. Pouvoir acidifiant des souches bactériennes en présence de l'acide linoléique.....	50
II.5.2. Production bactérienne de CLA in vitro.....	52
II.6. Conclusion.....	55
CHAPITRE III : Effets des Isomères Bactériens de L'Acide Linoléique Conjugué (CLA) chez des Rats Wistar à Obésité Nutri-Induite par un Régime Hyper-Gras....	56
III.1. Résumé.....	56

III.2. Abstract.....	56
III.3. Introduction.....	57
III.4. Matériels et méthodes.....	57
III.4.1. Matériels.....	57
III.1.4.1. Souches bactériennes.....	57
III.1.4.2. L'Acide linoélique.....	58
III.1.4.3. Modèle animal utilisé.....	58
III.1.4.4. Les milieux de culture.....	58
III.4.2. Méthodes.....	58
III.4.2.1. Traitement des animaux.....	58
III.4.2.2. Composition des régimes.....	59
III.4.2.4. Implantation des souches dans le tube digestif des rats.....	59
III.4.2.5. Production de CLA in vivo.....	59
III.4.2.6. Sacrifice des animaux, récupération du sang et des organes.....	59
III.4.2.7. Test de translocation bactérienne.....	59
III.4.2.8. Détermination des paramètres biochimiques.....	61
III.4.2.9. Traitement statistique des résultats.....	62
III.5. Résultats et discussion.....	62
III.5.1. Implantation des souches dans le tube digestif des rats et translocation Bactérienne.....	62
III.5.2. Production de CLA in vivo par les souches.....	63
III.5.3. Gain pondéral, poids des organes et paramètres sériques biochimiques.....	64
III.6. Conclusion.....	71
CHAPITRE IV : Effets des Isomères Bactériens de l'Acide Linoléique Conjugué (CLA) sur les Tissus Hépatique et Adipeux des Rats à Obésité Nutri-Induite par un Régime Hyper Gras.....	72
VI.1. Résumé.....	72
VI.2. Abstract.....	72
VI.3. Introduction.....	73
VI.4. Matériels et méthodes.....	74
IV.4.1. Matériels.....	74
IV.4.2. Méthodes.....	74
IV.4.2.1. Protocole expérimental.....	74

IV.4.2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement d'organes.....	74
IV.4.2.3. Préparation d'homogénats d'organes.....	74
IV.4.2.4. Dosage du cholestérol total et des triglycérides.....	75
IV.4.2.5. Analyse histopathologique.....	75
IV.4.2.6. Analyse statistique des résultats.....	76
VI.5. Résultats et discussion.....	76
IV.5.1. Contenu en lipides du foie (cholestérol total et triglycérides).....	76
IV.5.2. Effet des CLA produits sur le tissu hépatique.....	78
IV.5.3. Teneurs en cholestérol total et en triglycérides du tissu adipeux.....	80
IV.5.4. Etude histopathologique du tissu adipeux.....	80
VI.6. Conclusion.....	83
CHAPITRE V : Effets des Isomères Bactériens de l'Acide Linoléique Conjugué (CLA) sur le Stress Oxydatif et l'Inflammation chez des Rats Wistar à Obésité Nutri Induite par un Régime Hyper Gras.....	84
V.1. Résumé.....	84
V.2. Abstract.....	84
V.3. Introduction.....	85
V.4. Matériels et méthodes.....	86
V.4.1. Matériel biologique, réactifs, mise en lots des rats et prélèvements.....	86
V.4.2. Méthodes de dosages	86
V.4.2.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	86
V.4.2.2. Dosage de l'activité superoxyde dismutase (SOD).....	86
V.4.2.3. Détermination de l'activité de la catalase (CAT).....	87
V.4.2.4. Dosage des prostaglandines PGE ₂	87
V.4.2.5. Dosage des protéines sériques totales.....	88
V.4.2.6. Dosage de l'albumine sérique.....	88
V.4.2.7. Analyse statistique des résultats.....	88
V.5. Résultats et discussion.....	88
V.5.1. Effet des isomères de CLA sur la peroxydation lipidique : taux de MDA.....	88
V.5.2. Activité des enzymes antioxydantes : SOD et CAT.....	90
V.5.3. Effet des isomères bactériens de CLA produits sur les prostaglandines E ₂	93
V.5.4. Effet des isomères de CLA produits sur la protéinémie et l'albumémie.....	95

V.6. Conclusion.....	97
Conclusion Générale.....	98
Références Bibliographique.....	101

Introduction Générale

Depuis les deux dernières décennies, une augmentation intense du nombre de personnes atteintes du syndrome métabolique a pris place à l'échelle mondiale. Ce phénomène épidémique serait dû en partie à l'épidémie d'obésité et de diabète (Ettinger, 2017).

L'obésité est aujourd'hui considérée comme une pandémie. En effet, l'OMS en a fait un problème de santé publique à l'échelle mondiale car l'épidémie d'obésité se poursuit sans relâche dans les pays occidentaux et augmente de façon plus spectaculaire dans le reste du monde, paradoxalement même dans les pays où la pauvreté et la malnutrition sont très répandues. De façon dramatique, les taux d'obésité sont en augmentation, non seulement dans les populations adultes, mais aussi chez les enfants. En effet l'augmentation du poids moyen s'observe dans toutes les tranches d'âge et dans tous les groupes socio-économiques.

A l'échelle mondiale, la prévalence de l'obésité a plus que doublé durant ces 30 dernières années. Ainsi, en 2013, il y avait environ 26 % d'adultes (> 20 ans) en surpoids et 13 % d'adultes obèses. De plus, en 2013, l'OMS dénombrait environ 40 millions d'enfants de moins de 5 ans en surpoids ou obèses (OMS, 2014).

L'obésité a été reliée à une inflammation systématique chronique de faible intensité. Elle se développe souvent chez les personnes s'alimentant d'une diète riche en gras et en sucrose (High Fat High Sucrose ou HFHS en anglosaxon). Une diète HFHS induirait une modification de la composition du microbiote intestinal entraînant ainsi une dysbiose intestinale (Shin et al., 2014).

La dysbiose intestinale favorise la production de lipopolysaccharides (LPS) et entraîne l'altération de la perméabilité intestinale ; ce qui favorise le passage accru des LPS dans la circulation sanguine. Ces LPS sont considérés comme étant le facteur déclencheur d'une inflammation chronique qui contribue au développement des désordres métaboliques (Xu et al., 2017).

Les relations entre inflammation du tissu adipeux et les complications métaboliques de l'obésité ont été évoquées il y a une quinzaine d'années. Tout récemment, Sanyal et al. (2017) ont montré que le tissu adipeux blanc (classiquement tissu de réserve énergétique) synthétisait le tumor necrosis factor α (TNF α), dont l'expression était élevée dans les adipocytes des souris obèses insulino-résistantes.

La sensibilité à l'insuline pouvait alors être neutralisée par un anticorps anti-TNF. Cependant, chez l'homme, cette approche s'est avérée peu efficace pour contrôler l'insulinorésistance mais un champ de recherche original était ouvert dans le domaine de l'inflammation et de l'obésité.

Ce champ de recherche a pris une dimension plus grande dès la découverte en 1994 de la leptine, cytokine adipocytaire, ayant un rôle fondamental dans le contrôle des voies hypothalamiques du métabolisme énergétique et dans le métabolisme des tissus périphériques (foie, muscle, pancréas, système immunitaire).

Une nouvelle approche thérapeutique pour prévenir et/ou réduire l'obésité et l'inflammation serait l'utilisation des isomères de l'acide linoléique conjugué (CLA) comme compléments alimentaires capables de procurer des effets bénéfiques sur la santé chez l'homme (Belury 2002; Coakley et al. 2006; Churrua et al. 2009; Evans et al. 2010; Bassaganya-Riera et al. 2012).

Ainsi, certaines études suggèrent que ces lipides uniques peuvent réduire le risque de maladies coronariennes, contribuer à la perte de poids, prévenir le diabète de type 2 et procurer une protection contre certains cancers. Toutefois, plusieurs des mécanismes d'action des CLA ne sont pas encore bien élucidés et des preuves scientifiques solides demeurent nécessaires pour que les allégations revendiquées soient mieux acceptées.

Les CLA se trouvent presque exclusivement dans les produits d'origine animale et sont dérivés de l'acide linoléique. On les trouve dans la graisse du lait, dans les produits laitiers et dans les viandes issues des ruminants. Ils peuvent être ajoutés dans les aliments (aliments fonctionnels) ou être consommés sous forme de capsules (nutraceutiques).

Les CLA comptent 28 isomères de position et de géométrie de l'acide linoléique, dont l'isomère bioactif prépondérant dans la diète est l'acide ruménique 18:2 cis-9, trans-11 qui représente plus de 90 % des isomères de CLA contenus dans le gras laitier (Basiricò et al., 2017).

En effet, lorsque les CLA se trouvent dans le système gastro-intestinal (SGI), ils interagissent avec les différentes composantes du microbiote colique qui y résident. Par conséquent, les CLA peuvent entraîner des changements importants au niveau de cet écosystème et sont probablement à l'origine de certains effets positifs rapportés.

En effet, comme certaines bactéries du rumen, plusieurs souches de bactéries lactiques et de propionobactéries utilisées comme ferments lactiques ont la capacité de produire des CLA à partir de l'acide linoléique durant la fermentation des produits laitiers (Hennessy et al. 2007).

Plusieurs études menées chez les animaux (Ringo et al. 1998; Dierick et al. 2002) et chez l'humain (Alonso et al. 2003; Coakley et al. 2003; Jenkins and Courtney 2003; Kankaanpää et al. 2004; Barrett et al. 2007) ont démontré que certains acides gras ont des effets bénéfiques sur le microbiote colique, notamment sur les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*.

Certaines souches ont montré une capacité à métaboliser des acides gras (AG) libres présents dans le milieu de culture pour régénérer leur membrane cellulaire et stimuler leur croissance. Les produits du métabolisme générés peuvent aussi être utilisés par d'autres souches cultivées simultanément.

On peut donc supposer que certains AG, dont les isomères de CLA, jouent un rôle important en tant que prébiotique pour soutenir la croissance de certains groupes bactériens du microbiote colique et, par conséquent, jouer un rôle important dans le maintien d'une microflore intestinale équilibrée. Cette synergie a été déjà rapportée lors d'essais in vitro utilisant des cultures pures individuelles dont celles ayant un fort potentiel probiotique (Endo et al. 2006).

Contrairement aux ruminants, la production humaine de CLA provenant de l'acide linoléique ne semble pas se produire à un niveau significatif. La quantité de CLA dans le tissu adipeux humain est donc directement liée à l'apport alimentaire (Lee et al., 2006).

Il est donc raisonnable de suggérer que, pour augmenter les isomères de CLA chez les humains, ils doivent être ingérés en tant que compléments alimentaires ou produits alternativement par le microbiote intestinal, ou par un probiotique ingéré qui pourrait utiliser l'acide linoléique alimentaire pour générer du CLA.

Cependant, et à notre connaissance, les effets anti-obésité et anti-inflammatoires de souches probiotiques productrices de CLA in vivo n'ont pas été explorés.

L'objectif de cette thèse sera d'étudier les effets anti-obésité et anti-inflammatoires de deux souches probiotiques productrices de CLA, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et

Bifidobacterium animalis subsp *lactis* Bb12 chez des rats Wistar mâles à obésité nutri-induite par un régime hyper-gras (High-Fat Diet ou HFD en anglosaxon).

Ce manuscrit est structuré en cinq chapitres, dont le premier passe en revue l'état de l'art sur le sujet ; et les quatre autres présentent des expérimentations individualisées, chacune focalisée sur un but précis.

Nous tenterons, tout le long de ce protocole, d'apporter les arguments scientifiques en faveur du rôle bénéfique des probiotiques dans la production *in vitro* et *in vivo* des isomères de l'acide linoléique conjugué et de leurs retombées positives sur la modulation du syndrome métabolique.

Chapitre I :
Syndrome Métabolique,
Probiotiques et Isomères
Conjugués de l'Acide
Linoléique

CHAPITRE I : Syndrome Métabolique, Probiotiques et Isomères Conjugés de l'Acide Linoléique

I.1. Le Syndrome Métabolique

I.1.1. Les différentes définitions du syndrome métabolique

On emploie aujourd'hui le terme « syndrome métabolique » (ou syndrome d'insulino-résistance) pour désigner la présence d'anomalies glucido-lipidiques (Nano et al., 2016) telles que:

- - L'intolérance au glucose (diabète de type 2, atteinte de la tolérance au glucose ou anomalie de la glycémie à jeun)
- L'insulino-résistance
- La dyslipidémie (particulièrement hypertriglycémie et baisse du taux de cholestérol des HDL)
- L'hypertension artérielle
- L'obésité abdominale

Néanmoins, il existe à l'heure actuelle de nombreuses définitions du syndrome métabolique fondées sur des consensus.

Le syndrome métabolique a tout d'abord été défini par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1998 qui avait mandaté un groupe d'experts pour réviser le diagnostic et la classification des diabètes. Le rapport définissait le syndrome métabolique et reconnaissait son rôle dans le développement du diabète et des maladies cardio-vasculaires. La définition proposée par le groupe d'experts de l'OMS a ensuite été légèrement modifiée en 1999 (OMS, 1999) pour certains seuils de définition des facteurs de risque (pression artérielle systolique et microalbuminurie). Le syndrome métabolique est ainsi défini par une anomalie de la régulation du glucose (diabète, anomalie de la glycémie à jeun, intolérance au glucose et/ou insulino-résistance) associée au moins à deux autres facteurs comme une hypertension, une dyslipidémie, une obésité ou une microalbuminurie (tableau 1).

Contestée dès sa parution, cette définition a été revue en 2001 par le comité du National Cholestérol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III), aux États-Unis, qui a rebattu les cartes, en considérant que le paramètre prépondérant était l'obésité viscérale, et non l'insulino-résistance, dont l'évaluation quantitative était trop complexe (tableau 2).

Ce consensus a également été critiqué à la suite des travaux de l'European group for the study of insulin resistance (EGIR) qui a proposé des normes spécifiques européennes

pour le tour de taille (> 94 cm chez les hommes, et > 80 cm chez les femmes (tableau 3) (Balcau et al., 2002).

Les sociétés savantes s'en mêlèrent à leur tour. L'association américaine des endocrinologues cliniciens (American Association of Clinical Endocrinologists, AACE) (tableau 4) (Einhorn et al., 2003) et l'Institut national américain du cœur, du poumon et du sang (National Heart, Lung, and Blood Institute, NHLBI) (Grundy et al., 2004) apportèrent chacun leur contribution à l'identité du syndrome. Trois ans plus tard, ce fut au tour de l'International Diabetes Federation (IDF/FID) de proposer un nouveau consensus, qui a fait la part belle au tour de taille, et durci les critères de dysglycémie (Alberti et al., 2005) (tableau 5).

Tableau 1 : Définition du syndrome métabolique selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS, 1998).

Résistance à l'insuline ou diabète de type 2 + 2 autres critères	Glycémie $\geq 1,10$ g/l, ou intolérance au glucose
Pression artérielle (PA) élevée	PA $\geq 140/90$ mm Hg, ou traitement antihypertenseur
Triglycérides	$\geq 1,50$ g/l
HDL-cholestérol	< 0,35 g/l (hommes) ; < 0,39 g/l (femmes)
Obésité	IMC > 30 kg/m ² et/ou rapport taille/hanche > 0,90 (hommes), > 0,85 (femmes)
Microprotéinurie	Albumine urinaire ≥ 20 μ g/min ; Alb/Cr \geq 30 mg/g

IMC : indice de masse corporelle ; Alb/Cr : rapport albuminurie/créatininurie (à partir d'un échantillon aléatoire d'urine)

Tableau 2 : Critères du syndrome métabolique selon le National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) (2001) : 3 critères sur 5 doivent être présents (Schlienger et Monnier, 2016)

Critères	Seuil diagnostique
Obésité abdominale	> 102 cm (hommes) ; > 88 cm (femmes)
Pression artérielle	≥ 130/85 mm Hg
Triglycérides	≥ 1,50 g/l
HDL-cholestérol	< 0,40 g/l (hommes) ; < 0,50 g/l (femmes)
Glycémie	≥ 1,10 g/l

Tableau 3 : Définition selon l'European Group for the study of Insulin Resistance ou EGIR (tour de taille adapté à la population européenne) : Hyper-insulinémie ou obésité abdominale + 2 autres anomalies (Schlienger et Monnier, 2016)

Périmètre abdominal	≥ 94 cm (hommes) ; ≥ 80 cm (femmes)
Triglycérides	≥ 1,50 g/l
HDL-cholestérol	< 0,4 g/l (hommes) ; < 0,5 g/l (femmes)
Pression artérielle	≥ 140/90 mm Hg
Glycémie	≥ 1,10 g/l

Tableau 4 : Définition proposée par l’American Association of Clinical Endocrinologists (AAACE), caractérisée par la non-prise en compte du diabète : 3 critères (Schlienger et Monnier, 2016)

Surpoids/obésité	IMC \geq 25 kg/m ²
Triglycérides	\geq 1,50 g/l
HDL-Cholestérol	< 0,40 g/l (hommes) ; < 0,50 g/l (femmes)
Pression artérielle	\geq 130/85 mm Hg
Anomalie glucosée	Glycémie à jeun : 1,10 à 1,26 g/l Glycémie 2h après une charge glucosée > 1,40 g/l
Autres facteurs de risque	Antécédent familial de diabète de type 2, hypertension artérielle ou maladie cardiovasculaire, syndrome des ovaires polykystiques, sédentarité, groupe ethnique ayant une forte probabilité de diabète de type 2 ou de maladie cardiovasculaire

Tableau 5 : Définition de l’International Diabetes Federation (IDF/FID), centrée sur le tour de taille propre à la région et/ou à un groupe ethnique + 2 critères (Schlienger et Monnier, 2016)

Triglycérides	> 1,50 g/l
HDL- Cholestérol	< 0,50 g/l (femmes) ; < 0,40 g/l (hommes)
Pression artérielle	Systolique \geq 130 mm Hg, ou diastolique \geq 85 mm Hg
Glycémie à jeun	\geq 1,00 g/l ou diabète de type 2 connu * Au-delà de 1,00 g/l, un test oral de tolérance au glucose est recommandé.

Depuis, plusieurs auteurs ont souligné le caractère hétéroclite de cette entité, qui paraît bien difficile à définir de façon universelle en dépit d'une tentative d'harmonisation ou de conciliation entre les différentes institutions et associations ayant fait des propositions auxquelles se sont jointes la société internationale d'athérosclérose (International Atherosclerosis Society, IAS) et l'association internationale d'étude de l'obésité (International Association for the Study of Obesity, IASO) (tableau 6) (Alberti et al., 2009).

Tableau 6 : Tentative d'harmonisation des critères du syndrome métabolique : 3 critères nécessaires (Schlienger et Monnier, 2016)

Tour de taille	Augmentation définie selon l'origine ethnique
Triglycérides	$\geq 1,50$ g/l, ou traitement spécifique de ce trouble lipidique
HDL-Cholestérol	$< 0,50$ g/l chez les femmes ; $< 0,40$ g/l chez les hommes
Pression artérielle	$\geq 130/85$ mm Hg, ou hypertension artérielle traitée
Glycémie à jeun	$\geq 1,00$ g/l

I.1.2. Anomalies biologiques dans le syndrome métabolique

En dehors des critères intégrés dans les définitions, un certain nombre d'autres anomalies biologiques sont souvent associées au syndrome métabolique.

L'excès de poids contribue à une élévation des marqueurs de l'inflammation, dont on sait maintenant qu'ils jouent un rôle important dans le développement et la progression des maladies cardio-vasculaires. L'interleukine-6 est une hormone sécrétée par le tissu adipeux viscéral dont la production augmente avec l'indice de masse corporelle. Elle contribuerait au syndrome métabolique en augmentant la production des VLDL et la synthèse des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (Cooke et al., 2016). Plusieurs études montrent d'ailleurs une forte association entre un taux élevé de protéine C réactive (CRP) et le syndrome métabolique et ses composantes (Ftouhi et al., 2010).

De même, des anomalies au niveau de l'un des facteurs de l'hémostase, l'inhibiteur du plasminogène (Plasminogen Activator Inhibitor-1), ont été décrites dans le syndrome métabolique. Chez l'insulino-résistant plus particulièrement, une expression anormalement élevée de PAI-1 est associée à une réduction de la fibrinolyse et à un risque cardio-vasculaire accru (Zayani et al., 2016).

Une autre anomalie, est la diminution de l'excrétion rénale d'acide urique chez les sujets obèses qui présentent un syndrome métabolique. Il en résulte une élévation de l'uricémie. Il s'agit d'un marqueur de plus en plus étudié, du fait de sa prévalence élevée et surtout de son rôle dans le stress oxydant et l'état inflammatoire associés à ce syndrome (Coutinho et al., 2007).

Enfin, la microalbuminurie est une augmentation faible mais pathologique de la quantité d'albumine excrétée dans les urines. Une microalbuminurie est fréquemment retrouvée chez les patients présentant un syndrome métabolique, si bien qu'en 1998, l'OMS décide même d'inclure cette anomalie dans sa définition du syndrome métabolique. Ainsi, dans une étude portant sur 78 patients atteints de syndrome métabolique, la prévalence de la microalbuminurie était de 38 %. De la même façon, cette microalbuminurie majore le risque cardio-vasculaire en cas de syndrome métabolique associé (Bendriess et al., 2012).

I.1.3. Obésité et inflammation

I.1.3.1. Définition et types de d'obésité

L'obésité est devenue rapidement un problème majeur de santé publique qui s'accompagne de nombreuses co-morbidités et d'un surcoût important pour les dépenses de santé. Selon la tendance récente de croissance de surpoids et d'obésité, il est prévu que d'ici 2030 plus que 57.8% de la population mondiale adulte serait atteinte de surpoids ou d'obésité (Doustmohamadian et al., 2016). L'obésité est définie comme une augmentation de la masse grasse par rapport à la masse non grasse ayant des effets néfastes sur la santé. Cette définition ne chiffre pas quantitativement l'adiposité mais implique qu'un certain niveau d'adiposité s'associe au risque en santé (Boirie et al., 2015).

En pratique clinique, le diagnostic de l'obésité se base sur un indice facilement utilisable : l'indice de masse corporelle (IMC), qui correspond au poids (en kg) divisé par le carré de la taille (en mètres). L'obésité est alors définie par un IMC supérieur à 30 kg/m². Néanmoins, cet indice est imparfait car il ne rend pas toujours compte de la quantité de masse

grasse (exemples du sportif, de la femme enceinte, du sujet âgé), ni de sa répartition, ni de la qualité du tissu adipeux.

Il est donc important de mieux définir les phénotypes des obésités en prenant en compte différentes dimensions allant des indices anthropométriques et cliniques, aux paramètres comportementaux ou biologiques jusqu'aux aspects tissulaires (anomalies du tissu adipeux par exemple) (Basdevant et Clément., 2013).

Il existe également d'autres types de mesures comme le tour de taille qui permet de déceler plus précisément un excès d'adiposité au niveau de l'abdomen, ou le rapport « tour de taille/tour de hanches » pour avoir une meilleure idée de la répartition de la masse grasse corporelle. Cependant, ces mesures sont seulement utilisées en complément de l'IMC. Ainsi, des chercheurs tentent de mettre au point de nouveaux outils de mesure de l'excès de masse grasse. En 2011, l'indice de masse adipeuse (IMA) a été étudié et publié mais n'est pas utilisé en médecine courante (Bergman et al., 2011).

Plus récemment, une équipe de chercheurs a développé et publié un nouvel indice, le Surface-Based Body Shape Index (SBSI) (Krakauer et Krakauer, 2012), basé sur quatre mesures principales: la surface corporelle, la circonférence du tronc vertical, la taille et le tour de taille. Ce nouvel indice est plus performant que l'IMC dans la prédilection de la mortalité associée à l'obésité (Rahman et Adjeroh, 2015).

Cependant, jusqu'à présent, la simplicité de l'utilisation de l'IMC en fait le principal outil prédictif dans les études médicales sur l'obésité.

La classification de l'OMS distingue 3 types d'obésité selon l'IMC en termes de sévérité : obésité type I ou modérée, pour un IMC entre 30,0 et 34,9 kg/m², obésité type II ou sévère pour un IMC entre 35,0 et 39,9 kg/m², et obésité type III ou massive pour un IMC supérieur à 40 kg/m² (tableau7). Il est montré en effet que plus l'IMC augmente et plus la morbi-mortalité s'élève.

Mais cette classification ne permet pas d'apprécier la répartition de la masse grasse. Une obésité androïde ou abdominale est définie par un tour de taille ≥ 80 cm chez la femme et ≥ 94 cm chez l'homme de race caucasienne, mesures anthropométriques utilisables pour les obésités modérées mais non applicables pour les obésités sévères et massives pour lesquelles d'autres examens se discutent (DEXA, scanner) (Vatier et al., 2014).

L'obésité abdominale et l'accumulation de graisse au niveau viscéral sont associées au développement de pathologies cardiovasculaires et métaboliques. D'autre part, au-delà de l'IMC, le phénotype des obésités doit intégrer des dimensions somatique, psychologique et fonctionnelle, comme le suggère l'Edmonton Obesity Staging System (EOSS) afin de mieux évaluer le stade d'évolution, la gravité et le pronostic pour adapter la prise en charge (Faucher et Poitou, 2015).

Tableau 7 : Classification selon le poids, l'IMC et le niveau de risque de morbidité associé

Classification		IMC (Kg/m ²)	Risque de morbidité
Maigreur	Extrême	≤ 15,9	Elevé
	Faible	16 à 18,4	accru
Poids normal		18,5 à 24,9	Faible
Surpoids		25 à 29,9	Accru
Obésité	Classe I, modérée	30 à 34,9	Elevé
	Classe II, sévère	35 à 39,9	Très élevé
	Classe III, morbide	≥ 40	Extrêmement élevé

I.1.3.2. Origine multifactorielle de l'obésité.

L'obésité est due au stockage excessif de graisse dans le corps. Or, de nombreux facteurs sont impliqués dans cette maladie tels que la génétique, la sédentarité et l'environnement. Cependant, elle résulte principalement d'un déséquilibre de la balance énergétique, c'est-à-dire d'une dépense énergétique insuffisante par rapport à l'apport journalier en calories via l'alimentation, et ce de façon répétée et continue à long terme (Fig. 1) (Faucher et Poitou, 2015).

Les altérations primitives du tissu adipeux pourraient être à l'origine de certaines formes d'obésité. Un des exemples est celui de certains médicaments, connus pour favoriser l'adipogénèse comme les corticoïdes ou les glitazones.

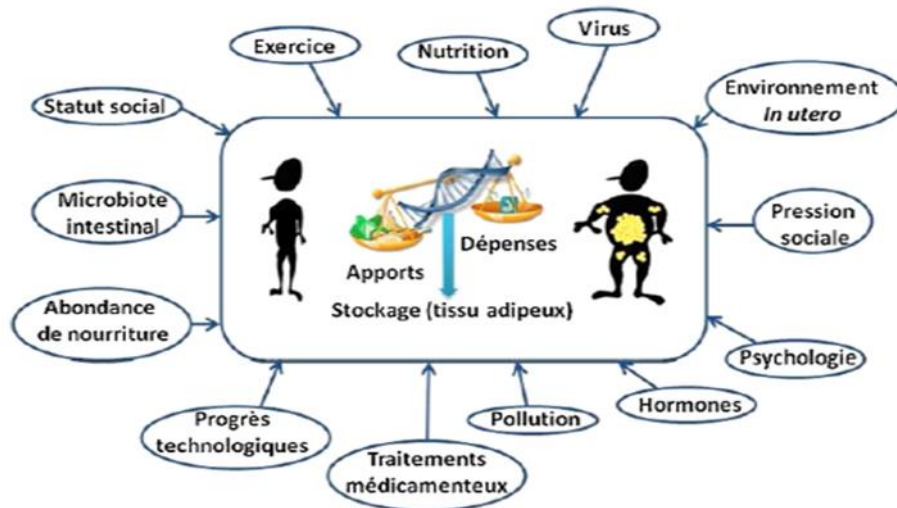


Figure 1 : Facteurs impliqués dans le développement de l'obésité (Faucher et Poitou, 2015)

Il a également été décrit des modifications des capacités de stockage du tissu adipeux et de l'inflammation en réponse au stress, à certains virus ou à des modificateurs endocriniens et polluants (Kim et al., 2012).

Des travaux récents (Khan et al., 2014; Rosenbaum et al., 2015) ont permis de mettre en évidence une corrélation positive entre la qualité de la flore intestinale et la susceptibilité plus ou moins importante de développer des maladies métaboliques liées à l'obésité. Les études menées par Ridaura et al. (2013) chez des souris axéniques (dépourvues de flore intestinale) ont clairement démontré le rôle important du microbiote intestinal dans l'homéostasie énergétique de l'hôte.

Chez l'homme, des données récentes (Belkaid et Hand, 2014; Winer et al., 2016) suggèrent également un lien entre microbiote, homéostasie énergétique (métabolisme glucido-lipidique) et homéostasie inflammatoire. L'étude de la flore intestinale a été favorisée par l'apparition de nouvelles techniques de métagénomique permettant de caractériser la diversité bactérienne. Celle-ci est réduite chez l'obèse ainsi que chez les patients ayant une alimentation peu riche en fibres (Yatsuneco et al., 2012).

I.1.3.3. Dysfonction du tissu adipeux associée à l'obésité

L'obésité est caractérisée par l'excès du tissu adipeux qui peut être classé en deux types : le tissu adipeux brun (Brown adipose tissue, BAT) et le tissu adipeux blanc (White adipose tissue, WAT) (Rosenwald et Wolfrum, 2014). Le tissu adipeux brun est

connu pour son rôle dans le processus thermogénique alors que le tissu adipeux blanc joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre énergétique. Il constitue un réservoir d'énergie mobilisable de l'organisme et un isolant thermique et mécanique en jouant le rôle de coussin au niveau des nombreux organes qu'il entoure (Cooke et al., 2016).

Les adipocytes représentent la composante cellulaire primaire du tissu adipeux blanc. Les lipides stockés dedans sont en flux constant et s'adaptent facilement à la demande nutritionnelle fluctuante (Cooke et al., 2016).

Par ailleurs, le tissu adipeux, outre les adipocytes, contient de nombreuses cellules notamment inflammatoires (macrophages) interagissant avec d'autres organes par la libération de nombreuses substances, les adipokines, qui sont autant de signaux adressés au système nerveux central, au foie, aux muscles, au cœur, aux vaisseaux et à l'intestin. Parmi elles, on retrouve au premier rang la leptine et l'adiponectine, puis la résistine et la visfatine, auxquelles s'associent des cytokines telles que le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF), l'interleukine 6 et le Monocyte Chemo-attractant Protein 1 (MCP1) (Faucher et Poitou, 2015).

La leptine est produite principalement par les adipocytes du tissu adipeux blanc, surtout au niveau sous-cutané en quantité parallèle à la proportion de masse grasse. Elle joue un rôle majeur au niveau du système nerveux central en stimulant les circuits neuronaux anorexigènes, mais a aussi un rôle dans la sensibilité à l'insuline, et l'état d'inflammation chronique observée dans l'obésité (Nalabolu et al., 2014).

L'adiponectine est également produite principalement par le tissu adipeux, en quantité inverse de la proportion de masse grasse. Elle est impliquée dans la sensibilité à l'insuline, dans l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique, et joue un rôle préventif lors de l'athérogénèse, tout comme dans la diminution de la réponse inflammatoire induite par TNF- α (Riestra et al., 2015).

Enfin, l'interleukine 6 (IL6) est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par de nombreuses cellules, y compris par les adipocytes, de façon augmentée dans l'obésité (Fasshauer et Bluher, 2015).

Au cours de l'obésité humaine, apparaissent progressivement des altérations structurales du tissu adipeux, perturbant fortement sa biologie. L'inflammation du tissu adipeux est maintenant reconnue comme un élément important des altérations tissulaires

observées au cours de l'obésité, participant à l'inflammation systémique bas grade et impliquées dans la physiopathologie des maladies cardio-métaboliques. Par exemple, le nombre de macrophages dans le tissu adipeux est relié au phénotype hépatique chez l'adulte (Tordjman et al., 2012). S'associe à l'inflammation, la fibrose, autre anomalie du tissu adipeux bien décrite chez le sujet obèse et reliée à des altérations métaboliques (Sun et al., 2013).

I.1.3.4. Adipocytes : Hypertrophie et hyperplasie

La graisse corporelle est stockée au niveau du tissu adipeux blanc dans les cellules adipeuses les plus petites, les adipocytes, dont le diamètre varie de 20 à 200 μm . Les adipocytes modulent des réponses physiologiques variées telles que le métabolisme lipidique et glucidique, la pression artérielle, l'inflammation, l'angiogénèse et l'homéostasie (Laforest et al., 2015). La graisse corporelle peut augmenter de deux façons :

- L'hypertrophie : augmentation du volume adipocytaire
- L'hyperplasie : augmentation du nombre d'adipocytes.

L'hyperplasie du tissu adipeux se produit pendant certaines périodes de la vie (la dernière moitié de la grossesse, la première année après la naissance et au début de la puberté) ou dans des situations spéciales comme l'obésité. Dans tous les autres cas, il reste le phénomène de l'hypertrophie (Bays, 2014).

Il est important que rappeler que contrairement à l'hypertrophie, l'hyperplasie est un phénomène irréversible (Parlee et al., 2014). Une accumulation excessive de triglycérides au niveau du tissu adipeux blanc provoque une augmentation progressive du volume adipocytaire. L'hypertrophie risque de compromettre l'intégrité des adipocytes qui, eux-mêmes, n'ont pas le pouvoir illimité d'augmenter leur volume, donc à une certaine limite, un adipocyte excessivement hypertrophique subit des hypoxies et des nécroses (Rosenow et al., 2013).

L'hypoxie adipocytaire cause une altération du tissu adipeux et un changement de la production des hormones stéroïdes et des adipokines, un développement du désordre métabolique et l'apparition d'une inflammation chronique avec l'infiltration des macrophages, la réduction des adiponectines et l'augmentation du taux de la leptine (Trayhurn, 2014).

a. La leptine

La leptine se comporte comme une hormone de la satiété, agissant par rétrocontrôle au niveau de l'hypothalamus afin de réguler l'appétit en fonction de la masse de TA créant ainsi une boucle régulatrice de la prise alimentaire. La leptine active la voie anorexigène qui coupe la faim et inhibe la voie orexigène qui stimule l'appétit (Surmacz, 2013). Cependant, les taux de leptine circulante et l'expression de l'ARNm dans le tissu adipeux sont augmentés chez les individus obèses, probablement en raison de l'existence d'une résistance à la leptine (Allison et Myers, 2014).

La leptine joue également un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du glucose, indépendamment des actions sur la consommation alimentaire, la dépense énergétique ou le poids corporel; car elle altère la signalisation de l'insuline dans les adipocytes murins. Ainsi, il a été montré que la leptine peut induire la lipolyse (Zeng et al., 2015).

Par ailleurs, la leptine est impliquée dans la régulation des réponses immunitaires. En effet, la leptine favorise la production de cytokines pro inflammatoires telles que l'IL (interleukine)-2 et l'IFN (interféron)- γ ; mais elle inhibe également la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 (Nalabolu et al., 2014).

De façon concomitante, les taux de leptine circulante et son expression dans le TA sont augmentés en réponse à des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β , et au LPS (lipopolysaccharide). En conséquence, les interactions entre la leptine et l'inflammation sont bidirectionnelles, les cytokines pro-inflammatoires augmentent sa synthèse et sa libération qui à son tour contribue à maintenir un état inflammatoire chronique au cours de l'obésité (Booth et al., 2015).

b. L'adiponectine

L'adiponectine a été découverte dans les années 1990 par quatre groupes indépendants. Elle est principalement produite et sécrétée par les adipocytes blancs matures non hypertrophiques. Elle joue un rôle essentiel dans la sensibilisation à l'insuline, la protection vasculaire et est également anti-inflammatoire (Divella et al., 2016); comme elle augmente, également, l'oxydation des lipides tissulaires par la promotion de la perte de poids, améliore la vasodilatation de l'endothélium-dépendante, réduit la production des radicaux libres oxygénés.

L'adiponectine possède une action anti-inflammatoire : réduit l'expression des protéines d'adhésion, la production du TNF- α , contracte les effets sur la fonction endothéliale, inhibe la différenciation des monocytes en macrophages et inhibe les effets des LDL (Low density lipoprotein) oxydés sur les cellules endothéliales des capillaires de la microcirculation contenues dans les organes adipeux et le réseau vasculaire (Nigro et al., 2014).

Les taux plasmatiques d'adiponectine sont réduits dans les cas de l'obésité abdominale chez l'homme et l'obésité post-ménopausale chez la femme, l'hypertension artérielle et l'hypertriglycéridémie du diabète de type 2 (Beg et al., 2015).

c. Les autres adipokines

Les adipocytes sécrètent également une multitude d'autres molécules, comme l'adipsine, l'apeline, des oestrogènes, des facteurs angiogéniques, des prostaglandines, des chimiokines, des protéines du complément, etc. Cependant, les adipokines proviennent également des autres types cellulaires composant le tissu adipeux et sont régulées de façon spécifique au cours de l'obésité (tableau 8) (Badimon et al., 2015).

I.2. Les probiotiques

I.2.1. Définition des probiotiques.

La définition actuelle des probiotiques est celle adoptée par le comité mixte d'experts FAO/OMS (2002) qui les définit comme "des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte". Cette dernière définition implique donc de définir des critères de sélections des microorganismes à activité probiotique.

I.2.2. Critères de sélection des probiotiques.

Les critères de sélection des souches probiotiques sont nombreux et drastiques. Ils ont été définis par un groupe mixte d'experts de l'OMS et de la FAO (fig. 2). Pour être érigée au statut probiotique, une souche doit avoir des caractéristiques lui permettant non seulement d'atteindre leur site d'action, en général l'intestin, mais aussi agir afin de procurer les effets bénéfiques chez l'hôte (Butel, 2014).

Tableau 8 : Fonctions, origines cellulaires et régulation des principales Adipokines au cours de l'obésité (Badimon et al., 2015)

Adipokines	Fonctions	Sécrétés par les	Obésité
Acides gras libres	Métabolisme lipidique	Adipocytes	Augmente
Adiponectine	Anti-inflammatoire ; sensibilité à l'insuline	Adipocytes	Diminue
Adipsine (facteur D du Complément)	Réponse immunitaire ; anti-lipolytique ; améliore la fonction des cellules β	Adipocytes et macrophages	Augmente
Angiotensinogène	Homéostasie vasculaire	Adipocytes et FSV	Augmente
Apeline	Sensibilité à l'insuline	Adipocytes, FSV et macrophages	Augmente
CCL2 (MCP-1)	Inflammation ; résistance à l'insuline ; Athérosclérose	Adipocytes et FSV	Augmente
CRP	Inflammation	FSV	Augmente
FABP4	Métabolisme lipidique	Adipocytes et macrophages	Augmente
Hormones stéroïdiennes	Métabolisme lipidique Résistance à l'insuline	Adipocytes et pré-adipocytes	Augmente
IL-10	Anti-inflammatoire ; sensibilité à l'insuline	Macrophage	Augmente
IL-18	Inflammation ; résistance à l'insuline ; diminue la prise alimentaire	FSV	Augmente
IL-1 β	Inflammation ; résistance à l'insuline ; Athérosclérose	Adipocytes et macrophages	Augmente
IL-6	Inflammation ; résistance à l'insuline ; Athérosclérose	Adipocyte et FSV	Augmente
IL-8	Inflammation ; athérosclérose	Adipocyte et FSV	Augmente
Leptine	Régulation de la prise alimentaire, l'angiogenèse et le système immunitaire	Adipocyte	Augmente
LPL	Métabolisme lipidique	Adipocyte	Augmente
Omentine	Résistance à l'insuline	FSV et macrophages	Diminue
PAI-1	Inflammation ; homéostasie vasculaire	Adipocytes et FSV	Augmente
Prostaglandines	Régule le flux sanguin, la lipolyse et la différenciation cellulaire	Adipocytes et FSV	Augmente
RBP4	Résistance à l'insuline	Adipocytes et macrophages	Augmente

Réistine	Inflammation ; résistance à l'insuline	Adipocytes et macrophages	Variable
TGF- β	Adhérence, migration, croissance, différenciation cellulaire et fibrose	Adipocytes et FSV	Augmente
Thrombospondine	Angiogenèse	Adipocyte	Augmente
TNF- α	Inflammation ; résistance à l'insuline ; Athérosclérose	Adipocytes et FSV	Augmente
Visfatine (Nampt)	Inflammation ; augmente la sécrétion d'insuline	Adipocytes et FSV	Augmente

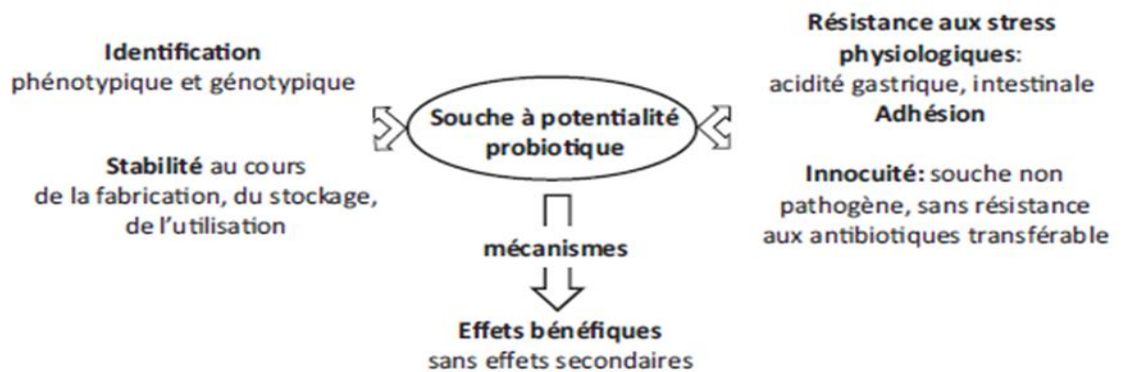


Figure 2 : Critères de sélection des souches probiotiques (Butel, 2014).

I. 2. 3. Principales souches probiotiques

La majorité des souches probiotiques (tableau 9) appartiennent à deux types de microorganismes producteurs d'acide lactique à savoir les bactéries lactiques et les bifidobactéries. Les bactéries lactiques comprennent les genres « *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* et *Streptococcus* ». Les espèces appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* sont les probiotiques les plus largement utilisées en industrie laitière (tableau 10).

I.2.4. Mécanismes d'action des probiotiques

Les probiotiques font actuellement l'objet d'un certain consensus dans la communauté scientifique quant à leurs effets bénéfiques sur la santé de l'hôte. Plusieurs mécanismes par lesquels certains probiotiques exercent des effets protecteurs ou thérapeutiques ont été proposés (fig.3) (Mizock et al., 2015). Toutefois, ces modes d'action ne sont pas encore complètement élucidés. Parmi ces principaux mécanismes d'action, on retrouve le renforcement de la barrière intestinale, l'inhibition de l'adhésion des pathogènes à la

muqueuse intestinale, la production de substances antimicrobiennes et la modulation du système immunitaire (Jonkers, 2016).

Tableau 9 : Principales souches probiotiques (Faure et al., 2013).

Genre	Espèces
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. reuterii</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. sporogenes</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. bifi dum</i> <i>B. adolescentis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. cremoris</i> <i>L. lactis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. clausii</i> <i>B. laterosporus</i> <i>B. pumilus</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae var boulardii</i>

Tableau 10: Exemples de produits commerciaux probiotiques (Barry et al., 2015).

Produit	Souche probiotique contenue
Activia yogurt (Dannon, Canada)	<i>B. lactis</i> DN-173 010 ≥100 Millions de bactéries vivantes /gramme
Align (Procter & Gamble)	<i>Bi. infantis</i> 35624 : 1 Billion UFC/capsule
Bacid (Erfa, Canada Inc.)	<i>L. rhamnosus</i> : 1 Billion de bactérie par capsule
Bio-K (Bio-K international)	<i>L. acidophilus</i> CL 1285, <i>L. casei</i> LBC80R 12.5 Billion/capsule (Force régulière) 25 Billion/capsule (extra force) 50 Billion/98 g bouteille de boisson
Culturelle (ConAgra Foods)	LGG 10 Billion bacteria +200 mg insuline/capsule
DanActive (Dannon, Canada)	<i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophiles</i> , <i>L casei</i> 410 Billion <i>L. casei</i> /bouteille
Florajen (American Lifetime, Inc., US)	<i>L. acidophilus</i> 20 Billions bactéries/capsule
Florastor (Biocodex)	<i>S. boulardii</i> 250 mg/capsule or packet
Howaru, Howaru Protect (Danisco)	<i>L. acidophilus</i> NCFM, <i>B. lactis</i> Bi-07 10 Billions de bactéries/capsule ou stick 5 Billions de bactéries/tablette
Jamieson Probiotic Sticks (Jamieson Natural Sources, Canada)	<i>L. helveticus</i> et <i>B. longum</i> 1 Billion UFC/ stick en poudre
Kefir (Lifeway)	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i> , <i>Strep diacetyllactis</i> , <i>S. florentinus</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. brevis</i> , et <i>B. lactis</i> : 7–10 Billions UFC/tasse
Lactinex (Benton, Dickinson & Co.)	<i>L. acidophilus</i> et <i>L. bulgaricus</i> 1 Million UFC/tablette, 100 millions UFC/packet
VSL#3 (Sigma-Tau Pharmaceuticals)	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , et <i>Strep thermophilus</i> 450 Billion de bactérie/pack et 225 Billions par deux capsules
Yakult (Yakult USA, Inc.)	<i>L. casei</i> Shirota 8 Billions de bactérie active par 80 ml bouteille

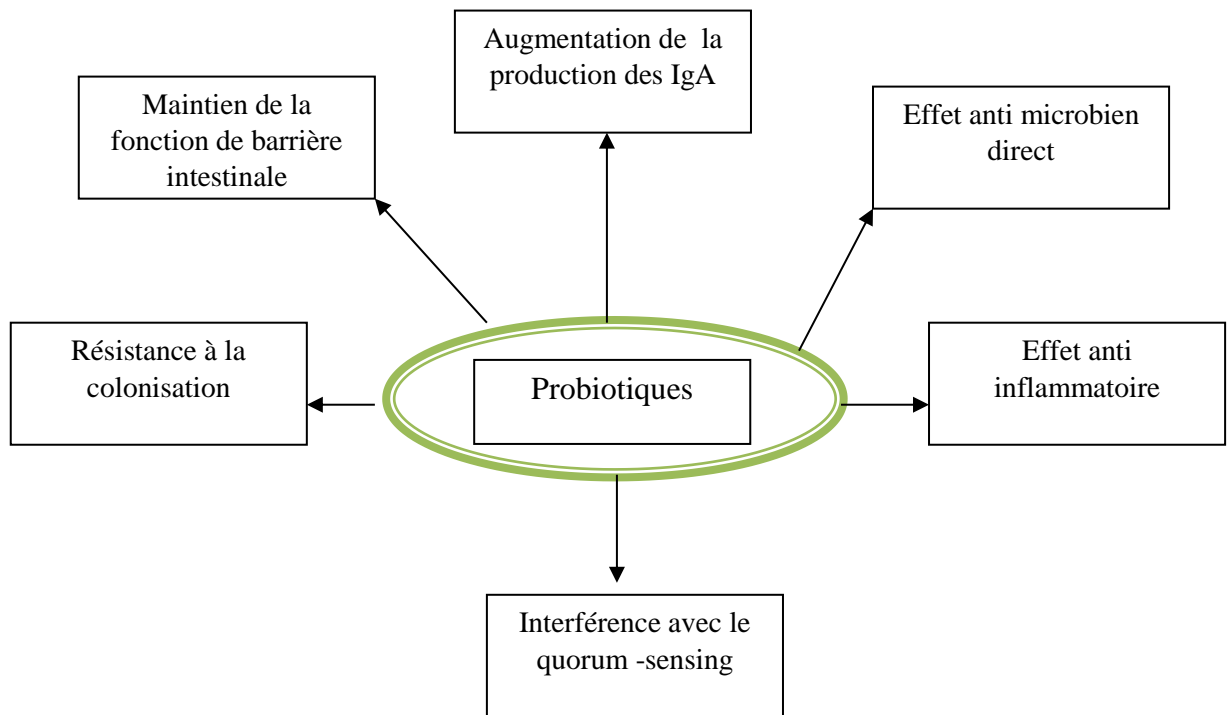


Figure 3 : Mécanismes d’action des probiotiques (Mizock et al., 2015)

I.2.4.1. Effet barrière des probiotiques

Les probiotiques protègent le tube digestif et l’organisme de l’implantation et de la multiplication de germes pathogènes ou opportunistes grâce à un “effet barrière” qui s’exerce entre autre par un processus de compétition au niveau des récepteurs d’adhérence à la muqueuse intestinale et par la production de substances antimicrobiennes, les bactériocines (Ranadheera et al., 2014).

I.2.4.2. Effets des probiotiques sur le système immunitaire

Les probiotiques modulent la réponse des IgA sécrétoires vis-à-vis des pathogènes. En effet, cette flore est capable d’augmenter localement le nombre de lymphocytes B sécrétant ces IgA sécrétoires. Elle développe également les mécanismes de la tolérance immunitaire vis-à-vis des protéines alimentaires et des bactéries intestinales. Au niveau périphérique, elle stimule la phagocytose protectrice contre l’infection et la synthèse des cytokines nécessaires à la réponse immunitaire (Patel et al., 2015).

I.2.4.3. Effets de la flore intestinale sur la production d'éléments essentiels et la détoxification

La flore intestinale, qui compte parmi elle de nombreux probiotiques, participe à la synthèse de vitamines (B2, B5, B9, B12, K). Elle assure également la production d'enzymes digestives et protectrices; comme elle est aussi impliquée dans la transformation métabolique de substances potentiellement cancérigènes. Elle module également les effets des toxines émis par les microorganismes pathogènes (Faure et al., 2014, Vandenas et al., 2015).

I.2.5. Effets des probiotiques sur la santé

La relation entre les probiotiques et notre santé peut être résumée dans les points et les faits suivants (Amara et Shibl, 2015) :

- Retirer l'effet secondaire des agents pathogènes ou des microbes nuisibles.
- Apporter à l'organisme des sous-produits utiles.
- Réduire les activités de notre système digestif.
- Réduire l'effet de la première attaque de composés nocifs par leur biofilm, qui protège notre système digestif.
- Réduire les besoins alimentaires de notre corps en raison de la bonne digestion et le bon métabolisme.
- Les probiotiques dans certains cas, pourraient compléter la déficience dans nos matériaux génétiques en nous aidant à emprunter les produits de leurs gènes (comme dans le cas de l'intolérance au lactose).

a. Probiotiques et diarrhées

Les infections intestinales — aiguës ou chroniques — sont une des principales cibles des probiotiques. Les probiotiques exercent leur effet barrière pour éradiquer les diarrhées d'origine infectieuse (Butel, 2014). Les souches *Lactobacillus* GG, *Lactobacillus reuteri*, *Saccharomyces boulardii* et *Bifidobacterium sp* sont utilisés pour le traitement des diarrhées en empêchant les virus et les bactéries pathogènes de se lier aux cellules épithéliales (Amara et Shibl, 2015).

b. Probiotiques et Maladies Intestinales Chroniques Inflammatoires (MICI).

Le rationnel de l'utilisation des probiotiques dans les MICI et les pathologies associées — maladie de Crohn (MC

), rectocolite hémorragique (RCH) et pochite — est fondé sur les relations très probables entre ces pathologies et une dysbiose.

Une diminution de la diversité bactérienne chez les patients atteints de MC ou l'association avec certains microorganismes tels que les *E. coli* adhésif-invasif (AIEC) ou *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* ont été observées.

Les dysbioses observées pourraient être responsables de l'expansion d'espèces pro-inflammatoires ou de la diminution de bactéries protectrices anti-inflammatoires. Certains probiotiques (*E. coli* souche Nissle, mélange VSL#3) ont montré une efficacité similaire au traitement classique dans la prévention des rechutes au cours des RCH inactives ou modérément actives (Butel, 2014 ; Amara et Shibl 2015, Vandenplas et al., 2015).

c. Probiotiques et *Helicobacter Pylori*

L'utilisation des probiotiques dans les inflammations gastriques chez les sujets colonisés par *H. pylori* est soutenue par de nombreuses observations. Les souches spécifiques de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* exercent des effets bactéricides contre *H. pylori in vitro* par la libération des bactériocines, et / ou l'inhibition de son adhérence aux cellules épithéliales. Ces effets protecteurs ont été confirmés dans des modèles animaux. Cependant, les essais cliniques sont très importants, car les résultats *in vitro* ne peuvent pas toujours se reproduire chez les patients (Vandenplas et al., 2015 ; Huang et al., 2014).

d. Probiotiques et autres pathologies gastro-intestinales

Le syndrome de l'intestin irritable (SII — ou colopathie fonctionnelle — est une affection chronique touchant 3 à 25 % de la population mondiale et caractérisée par des douleurs abdominales récurrentes et des ballonnements associés à des troubles du transit (diarrhée ou constipation). L'utilisation des probiotiques dans le traitement de cette affection vient après les recommandations pour une hygiène de vie adéquate, et leur mode d'action passerait en partie par leurs effets anti-inflammatoire et immunomodulateur, ainsi que par ceux sur l'hypersensibilité viscérale et l'anxiété (Butel , 2014 ; Miock et al., 2015).

e. Probiotiques et cancers gastro-intestinaux.

Depuis que le microbiote est soupçonné impliqué dans la génèse des cancers gastro-intestinaux, ses manipulations bénéfiques pourraient avoir des effets thérapeutiques et/ou préventifs. Leurs mécanismes de prévention / traitement du cancer gastro-intestinal (en particulier le cancer colorectal ou CRC) ne sont pas encore pleinement caractérisés. Les données proviennent principalement à partir des modèles in vitro et animaux, les données humaines étant encore insuffisantes. Selon Serban (2014), ces mécanismes seraient:

- L'action compétitive avec les bactéries putréfiantes ou pathogènes et la concurrence pour les nutriments et les facteurs de croissance,
- L'inactivation des liaisons des composés cancérigènes mutagènes et génotoxiques, Les espèces de Lactobacille et Bifidobactérie sont capables de se lier avec les pyrolysats mutagènes, in vitro et chez des souris, cependant l'effet antimutagène de *L. plantarum* KLAB21 est médié par trois glycoprotéines extracellulaires. *B. longum* et le lactulose augmentent l'activité de la glutathion-S-transférase colique (enzyme impliquée dans la détoxification des métabolites toxiques et cancérigènes).
- La modification des activités métaboliques de la microflore intestinale (inhibition des enzymes bactériennes nocives).
- La stimulation de l'immunité anti-tumorale de l'hôte en stabilisant les jonctions épithéliales.
- La production des composés anti-tumorigènes ou anti-mutagènes, qui interagissent directement avec les cellules tumorales et inhibent leur croissance.
- La production des isomères de l'acide linoléique conjugués (CLA), dont les effets sont anti-inflammatoires et anti carcinogènes avec des propriétés de prévention contre le cancer.
- La modification des conditions physico-chimiques dans le côlon en réduisant en particulier le pH intestinal.
- Les effets sur la physiologie de l'hôte en augmentant ou en diminuant l'activité enzymatique, et en réduisant l'absorption de composés mutagènes de la lumière intestinale.
- Les effets anti- prolifératifs (stimulation de la différenciation cellulaire, inhibition du développement tumoral - par le butyrate, ainsi que des effets immunitaires).

f. Probiotiques et allergies

C'est à travers des études épidémiologiques sur le microbiote que la relation entre probiotiques et allergies est devenue réalité. Cependant, beaucoup d'études sont contradictoires en ce qui concerne l'asthme, la rhinite, l'eczéma et les allergies alimentaires (Tang et al., 2015 ; Vandenas et al., 2015 ; Cuello- Garcia et al., 2015, Albin et al., 2015).

Les différences observées entre les études sont très certainement dues à des différences dans les populations étudiées, en termes de type d'allergie, du stade d'évolution de la maladie, de l'environnement, du fond génétique, mais aussi du ou des probiotiques utilisés, des doses, de la durée d'administration, de la période d'administration par rapport à l'évolution de l'allergie, et enfin de la durée du suivi (Butel et al., 2014).

g. Probiotiques et immunité

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont validé les propriétés immuno-stimulatrices des probiotiques (Patel et al., 2015). L'effet des différentes souches probiotiques sur les cytokines pro-inflammatoires Th1 (IFN- γ , le TNF- α , IL-6) et anti-inflammatoires Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) et les réponses des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) des patients allergiques à l'entérotoxine A et aux acariens a été évalué.

Les souches lactiques (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus gasseri* PA16 / 8, *Bifidobacterium bifidum* MP20 / 5 et *Bifidobacterium longum* SP07 / 3) et leurs ADN inhibent les cytokines Th2-génomiques (IL-4 et IL-5) et améliorent la stimulation de l'IFN- γ chez les patients. En outre, les souches *Bifidobacterium* B-2458 et *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* GB 1496 isolées à partir du lait maternel humain augmentent la production des cytokines Th1 et atténuent la production de cytokines Th2 à partir de cellules PBMC humaines (Chiu et al., 2014).

Les études récentes révèlent que la souche *Lactobacillus crispatus* augmente le taux de l'interleukine IL-12 et IFN- γ (Talpur et al., 2014), *Lactobacillus plantarum* 06CC2 améliore la phagocytose (Ahmed et al., 2014), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* IMVB-7281 inhibe le développement de la dermatite et l'élévation du marqueur inflammatoire, le sérum amyloïde A (Aragon et al., 2014), *Lactobacillus delbrueckii* ssp.

Bulgaricus OLL1073R-1 et *Lactobacillus paracasei* stimulent les cellules NTK et réduisent les risques de l'eczéma atopique et la rhino-conjonctivite chez les nourrissons (Bertelsen et al., 2014).

Bacillus circulans protège contre l'infection de *V. vulnificus*, améliore l'immunité innée, augmente la concentration sérique des IgM et inhibe la prolifération de *E.coli*. La souche *S. cerevisiae* améliore l'effet immunosuppresseur de l'infection à *Trypanosoma*, réduit la gravité des diarrhées et l'infection à *Clostridium difficile*, augmente la concentration sérique en IgM et inhibe la prolifération de *E. coli* (Ahmed et al., 2014).

h. Probiotiques et maladies hépatiques

La composition du microbiote intestinal et ses variations jouent un rôle important dans le développement des maladies du foie. Dans les conditions pathologiques, les composants bactériens sont libérés au niveau de l'axe foie-intestin provoquant des réponses auto-immunes et pro-inflammatoires conduisant ainsi à l'initiation de dommages au niveau des hépatocytes (Chávez-Tapia et al., 2015).

Les probiotiques ont montré des effets favorables vis-à-vis de ces dommages par la réduction de la production des toxines, la modulation des réponses auto-immunes, inflammatoires et la perméabilité intestinale (Ranadheera et al., 2014).

Ces effets ont été confirmés par de nombreuses études cliniques: l'administration des VSL # 3 a diminué les niveaux d'endotoxines, l'expression de TNF- α et la perméabilité intestinale paracellulaire chez un modèle murin atteint de maladie du foie alcoolique, *Lactobacillus rhamnosus* et *acidophilus* réduisent légèrement les lymphocytes intra hépatiques et l'expression du TNF- α (Hong et al., 2015). *Saccharomyces boulardii* est capable de réduire la stéatose hépatique par l'abaissement de la teneur lipidique du foie et l'inflammation systémique hépatique à faible degré (Everard et al., 2014).

En outre, dans un modèle murin de la cirrhose, une immuno-modulation de TLR2-dépendante a été observée avec *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (Moratalla et al., 2015) ; tandis qu'une réduction significative de l'endotoxémie et des niveaux de TNF- α a été détectée chez les patients souffrant d'encéphalopathie hépatique minimale, après l'administration de *Lactobacillus GG* (Bajaj et al., 2014).

i. Probiotiques et obésité

Le microbiote intestinal est l'un des facteurs déterminant l'obésité étant donné son rôle dans la régulation des fonctions métaboliques de l'hôte. Quelques souches de ce

microbiote affectent les maladies métaboliques y compris l'obésité (Park et Bae, 2015).

Le gain de poids corporel induit par le microbiote pourrait être modulé par l'administration des probiotiques (Ishimwe et al., 2014). Sur le plan théorique, il est admis que les probiotiques induisent des changements qualitatifs au niveau de la flore intestinale ; ce qui limite l'absorption des lipides par l'hôte, conduisant à une amélioration de la lipidémie. Concernant l'effet hypocholestérolémiant des probiotiques, plusieurs mécanismes ont été proposés (Guida et Venema, 2015) :

- La déconjugaison de la bile par l'activité hydrolase des sels biliaires (BSH).
- L'incorporation du cholestérol dans les membranes des probiotiques.
- La co-précipitation du cholestérol par la bile déconjugée.
- La conversion du cholestérol en coprostanol.
- La modulation de l'angiopoietine like -4 (*ANGPTL4*).

Des études récentes chez des souris soumises à un régime obésogène montrent que les souches *Lactobacillus rhamnosus* PL60 et *L. plantarum* PL62 sont capables de produire l'acide linoléique conjugué (conjugated linoleic acid ou en abrégé CLA) qui contribue à la réduction du poids corporel.

La consommation du lait écrémé fermenté contenant la souche *Lactobacillus gasserii* SBT2055 régule la croissance du tissu adipeux chez le rat par l'inhibition de l'absorption des lipides alimentaires. Les souches *Lactobacillus curvatus* HY7601 et *L. plantarum* KY1032 contrôlent le gain du poids et régulent l'accumulation des graisses chez les souris obèses par la modulation des gènes pro-inflammatoires au niveau du tissu adipeux et des gènes liés à l'oxydation des acides gras au niveau du foie.

I.3. Acide linoléique conjugué (CLA)

I.3.1. Définition.

L'acide linoléique conjugué, communément désigné par l'abréviation CLA de « Conjugated Linoleic Acid », regroupe une famille d'au moins 28 isomères de l'acide linoléique qui se trouvent surtout dans les produits carnés et laitiers provenant des ruminants (Moon, 2015). Comme son nom l'indique, ses doubles liaisons sont conjuguées (Gorissen et

al., 2012). Elles peuvent être cis / trans, cis / cis ou trans / trans de la position 6 à 14, l'isomère cis-9 / trans-11 est plus abondant ($\geq 90\%$) (fig.4) (Martínez-Monteagudo et al., 2015).

Le CLA a été découvert accidentellement par Pariza et ses collaborateurs (Pariza et al., 1985) à la recherche des agents mutagènes chez le bœuf quand en 1979 des chercheurs de l'Université du Wisconsin ont appliqué un extrait de bœuf sur la peau des souris exposées à une substance cancérigène forte où ils ont remarqué que cet extrait avait réduit 20% de tumeurs (Moon, 2015). Cet anti cancérigène n'a été identifié qu'en 1987 (Ha et al., 1987).

En 1985, les CLA ont été décrits pour la première fois comme des isomères positionnels et géométriques des diénoïques conjugués dérivés de l'acide linoléique (Viladomiu et al., 2015). C'est en juillet 2008, que le statut GRAS a été accordé aux CLA par la FDA pour certains aliments comme le lait, les yaourts, les barres nutritionnelles, les jus de fruits et le lait de soja (Daley et al., 2010).

I.3.2. Sources des CLA

Les CLA sont des constituants naturels des aliments qui proviennent du tissu adipeux des animaux et des produits laitiers. Ils sont issus de la biohydrogénation des lipides et la désaturation hépatique. Ils sont naturellement produits dans le rumen des bovins comme métabolites intermédiaires des bactéries intestinales qui fermentent l'acide linoléique en acide stéarique.

C'est à travers la désaturation des dérivés de l'acide oléique, plus précisément, que les microbes du tractus gastro-intestinal des ruminants, comme les vaches et les chèvres, convertissent l'acide linoléique en isomères de CLA par biohydrogénation. C'est un processus qui consiste à changer la position ou la configuration d'une ou de deux doubles liaisons de sorte qu'elles ne soient pas séparées par deux liaisons simples (Viladomiu et al., 2015).

Bien que le taux de CLA dans les viandes dépend du régime alimentaire des animaux, il reste toutefois en très faible quantité, de l'ordre de 2 à 5 mg /g du gras total ; par conséquent, ces aliments ne représentent plus une véritable source de CLA à l'heure actuelle (tableau 11) (Koba et Yanagita, 2014).

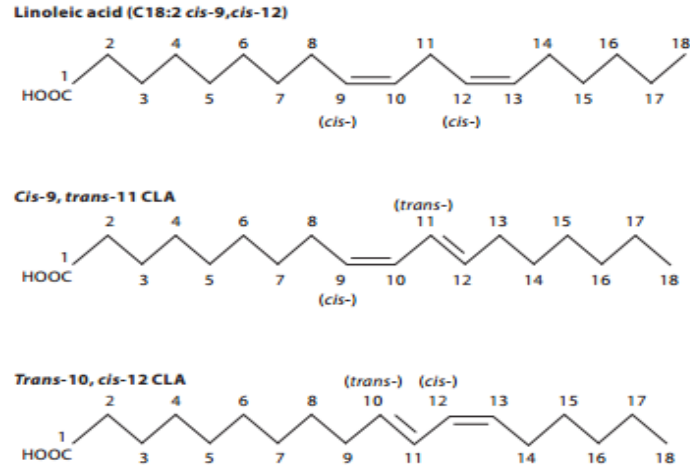


Figure 4 : Structure des isomères *cis*-9, *trans*-11 (CLA) et *trans*-10, *cis*-12 (CLA), les deux principaux isomères de l'acide linoléique (Shen et McIntosh, 2016).

I.3. 3. Production et synthèse des CLA

I.3.3.1. Production microbologique

a. Production ruminale

L'acide linoléique et l'acide linoléique représentent les deux acides gras les plus abondants dans l'alimentation animale et dans le rumen. Ils sont libérés dans le rumen par hydrolyse par les enzymes de la flore ruminale comme les lipases pour les réactions d'isomérisation et d'hydrogénation. L'hydrogénation de ces deux acides gras se passe de la même manière, mais les produits intermédiaires sont différents (fig.5) (Van Nieuwenhove et al., 2012).

L'hydrogénation de l'acide linoléique produit comme premier intermédiaire l'isomère *c*9, *t*11-CLA par un processus où la double liaison du C-12 est transférée au C11 par la linoléate isomérase (EC 5.3.1.5, LAI). La seconde étape consiste à une conversion rapide en *t*11- C18:1 (acide *trans* vaccénique, TVA) qui est hydrogéné en acide stéarique (C18:0) et en un deuxième autre isomère, le *t*10, *c*12, qui est produit par différents microorganisme comme *Butyrivibrio fibrisolvens* et *Megasphaera eldsenii* ; mais l'hydrogénation de cet isomère ne donne pas l'acide vaccénique mais le C6, *t*10-C18:2 qui est ensuite converti en C18 :0 (Viladomiu et al., 2015)

Tableau 11 : Contenu en CLA de divers aliments(Koba et Yanagita, 2014).

Aliment	CLA totaux (mg/g gras)	9c,11t-18:2 (%)
Viandes et poissons		
Bœuf	4.3	85
Veau	2.7	84
Mouton	5.6	92
Porc	0.6	82
Poulet	0.9	84
Jaune d'œuf	0.6	-
Saumon	0.3	-
Crevette	0.6	-
coquille	0.3	-
Lait et produits laitiers		
Lait	5.5	92
Beurre	4.7	88
Yourte	4.8	84
Crème glacée	3.6	86
Fromage crémeux	3.8	88
Cheddar	3.6	93
Fromage parmesan	3.0	90
Fromage fondu américain	5.0	93
Huiles		
Huile de colza	0.5	44
Huile de maïs	0.2	39
Huile de carthame	0.7	44
Huile d'olive	0.2	47

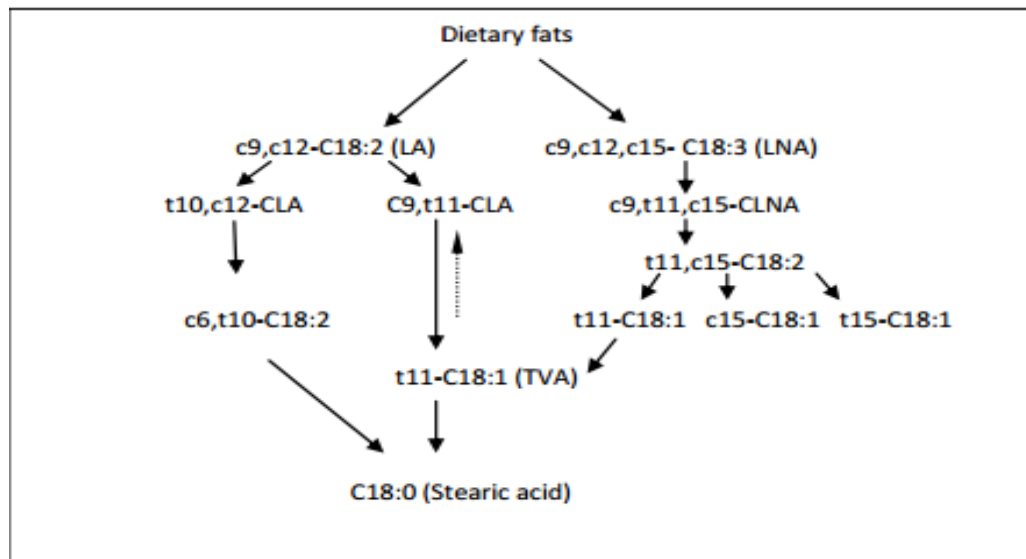


Figure 5 : Biohydrogénation de l'acide linoléique et l'acide linoléique dans le rumen (Van Nieuwenhove et al., 2012).

b. Production des CLA par les probiotiques

Bien que la souche anaérobie *Butyrivibrio fibrisolvens* soit la première bactérie révélée productrice de CLA, elle n'est pas la seule. En effet, d'autres souches isolées à partir des produits laitiers et des intestins des humains et des animaux se sont montrées capables de les produire y compris les bactéries lactiques et les bifidobactéries.

Actuellement, les lactobacilles *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. acidophilus*; le lactocoque *Lactococcus lactis*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Bifidobacterium sp*, *Streptococcus* et d'autres ont la capacité de former les CLA (Van Nieuwenhove et al., 2012).

La figure 6 montre les mécanismes du processus d'isomérisation des bactéries lactiques et d'autres microorganismes qui conjuguent l'acide linoléique. La conjugaison de l'acide linoléique par l'acide linoléique isomérase (LAI) de *Lactobacillus plantarum* implique la synthèse d'un intermédiaire hydroxylé. Cette enzyme catalyse aussi la conversion de cet intermédiaire en isomères c9,t11 (CLA 1) et t9,t11. *Propionibacterium acnes* convertit l'acide linoléique en isomère t10,c12 (CLA 2) par l'action d'une isomérase soluble (Vela Gurovic et al., 2014).

L'isomérase de *Clostridium sporogenes* est une enzyme associée à la membrane qui convertit l'acide linoléique en isomère c9, t11 (Kishino et al., 2011). Ce dernier est aussi produit à partir de l'acide t-vaccénique par la 9-désaturase. Il est présent dans les glandes mammaires du bétail, des humains et chez les champignons filamenteux. La lionéate isomérase de *Lactobacillus acidophilus* convertit l'acide linoléique en CLA 1 et CLA 2 et en d'autres isomères (Vela Gurovic et al., 2014).

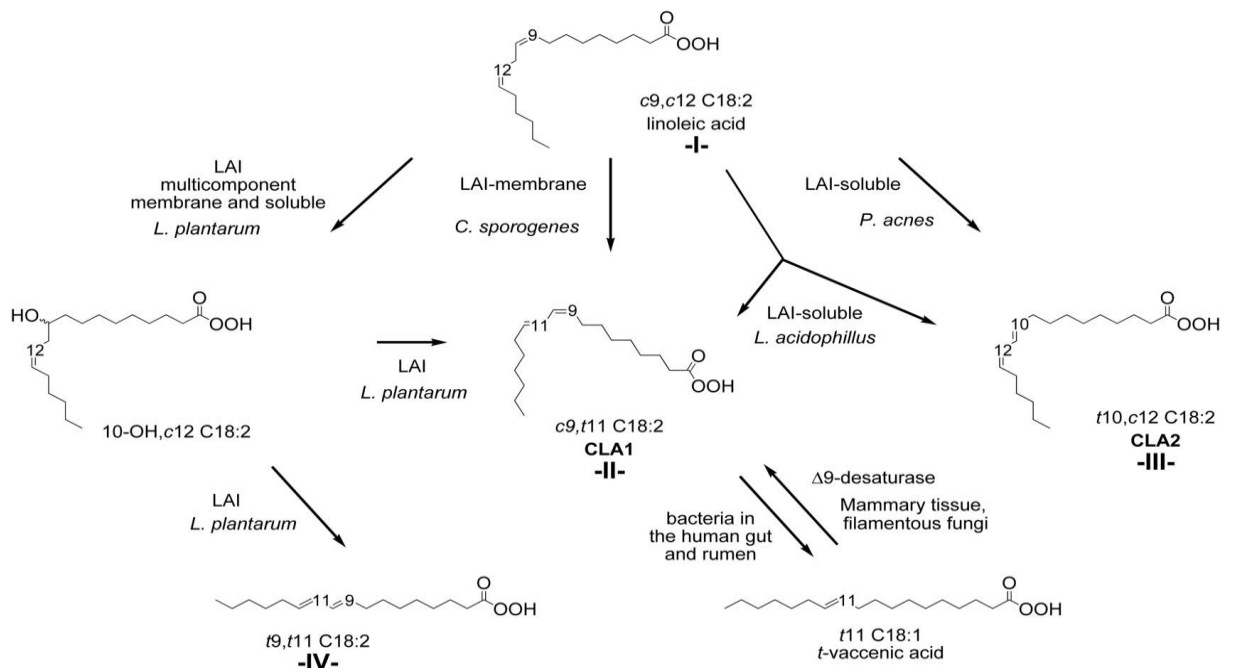


Figure 6 : Bioconversion de l'acide linoléique par les bactéries lactiques (Vela Gurovic et al., 2014).

I.3.3.2. Substrats alternatifs pour la production de CLA

Bien que les acides gras libres soient les substrats les plus couramment utilisés pour tester la capacité des souches à produire les CLA, d'autres substrats alternatifs sont en cours d'évaluation. Beaucoup d'études utilisent les huiles végétales hydrolysées ou non hydrolysées et les mono ou di linoléines comme source exogène d'acides gras. Par conséquent, dans le cas d'huiles non hydrolysées, la bactérie doit avoir la capacité d'hydrolyser les triglycérides et de libérer l'acide linoléique ou l'acide linoléinique pour la

conversion. Le taux de conversion des monolinoléines en CLA par *B. breve* est plus élevé que celui de l'acide linoléique ou des dilinoléines (Choi et al., 2008).

Les huiles de tournesol, de soja, de canola, de ricin et de carthame sont utilisées comme source d'acide linoléique pour la production de CLA dans le lait (Rodriguez-Alcala et al., 2011, Van Nieuwenhove et al., 2011).

I.3.3.3. Les CLA de synthèse chimique

Aujourd'hui, les CLA sont produits à l'échelle industrielle à partir d'huiles végétales qui sont transformées à température élevée (Philippaerts et al., 2011) par catalyse en milieu alcalin permettant l'obtention d'un haut rendement de deux isomères, le c-9, T-11 et T-10, c-12 CLA, dans un rapport égal à l'unité (Philippaerts et al., 2011 ; Salamon et al., 2014). Plusieurs méthodes catalytiques existent pour la production industrielle des CLA.

a. Méthode catalytique homogène de production industrielle des CLA

Pour la production des CLA avec catalyseurs organométalliques homogènes, des huiles contenant du CLA-chrome, le platine, le ruthénium, et des complexes de rhodium ont été testés. La productivité la plus élevée avec de tels catalyseurs était de 97%. Des hauts rendements peuvent être obtenus à partir des huiles végétales ayant une teneur élevée en acide linoléique par isomérisation alcaline dans des solvants apolaires (Dianóczki et al., 2010).

b. Méthode catalytique hétérogène de production industrielle des CLA

La plupart des catalyseurs hétérogènes contiennent des métaux de transition pour la réaction de conjugaison avec les doubles liaisons des acides gras polyinsaturés. Ce mécanisme engage trois étapes : chimisorption de l'hydrogène moléculaire, chimisorption de la double liaison du substrat et migration d'un atome d'hydrogène de la surface du catalyseur vers l'un des atomes de carbone du substrat adsorbé (Salamon et al., 2014).

c. Synthèse des CLA par isomérisation biphasique avec des métaux transitionnels

Le système catalytique biphasique a l'avantage d'offrir une grande surface pour la réaction de deux phases non miscibles de substrat et de catalyseur dissous dans un solvant approprié qui sont agités, et une récupération facile du catalyseur lorsque les deux phases

sont séparées. Cette méthode a également été utilisée pour la conjugaison des différentes huiles végétales, parmi lesquelles l'huile de tournesol (Quirino et Larock, 2012).

d. Obtention des CLA par méthode photochimique

Les scientifiques japonais (Seki et al., 1998) ont obtenu des esters méthyliques de CLA avec un rendement élevé (80%) en utilisant l'iode comme photocatalyseur et avec une irradiation avec la lumière visible intense. Cette méthode fut appliquée pour la production d'huile végétale riche en CLA par isomérisation directe de l'huile de soja par irradiation de lumière UV d'un substrat sans solvant (Gangidi et Proctor, 2004). Récemment, l'isomérisation de l'huile de soja a été réalisée dans un photo-réacteur, irradié avec une lampe UV-Vis donnant 220 mg d'huile CLA / g de soja. Le principal isomère (env. 80%) était le CLA *tt* (Jain et al., 2008).

Il est important de souligner qu'en raison de la nature du radical de la réaction photocatalytique, l'isomérisation doit être effectuée dans une atmosphère inerte pour assurer une haute chimio sélectivité (Philippaerts et al., 2011).

I.3.4. Effets des CLA sur la santé

I.3.4.1. CLA et cancer

Le rôle des isomères de CLA dans la prévention des cancers a été bien démontré. Le CLA est un inhibiteur efficace de toutes les étapes de la cancérogenèse ; l'initiation, la promotion et la métastase, aussi bien que la néovascularisation ou l'angiogenèse. De nombreuses études ont mis en évidence l'activité anti-cancéreuse des CLA (Yang et al., 2015).

Les études sur des modèles animaux ont démontré qu'une mixture de CLA ou les isomères *c9*, *t11-t10* CLA ou *c12*-CLA administrés exclusivement à un taux entre 0,05 et 1% (P/P) inhibent les tumeurs de la glande mammaire chimio-induites. (Mc Gowan et al., 2013; Rakib et al., 2013).

Le CLA a montré un effet anti prolifératif contre le cancer du côlon ; alors que pour sa part, l'isomère *trans* 10-*cis* 12 induit la mort cellulaire et exerce un effet anti prolifératif de la lignée cellulaire Caco-2. Ceci atteste que le CLA induit une cytotoxicité cellulaire via les deux voies de signalisation PPAR γ et APC / bêta-caténine (Moon et al., 2015).

De même, des études in vitro (Elroz et al., 2013 ; Moon et al., 2015 ; Rakib et al., 2013) ont démontré qu'à la fois, les isomères C9, t11 et t10-CLA et le c12 CLA ainsi qu'une mixture d'isomères sont anti prolifératifs contre une gamme de différentes lignées cellulaires, y compris celles du cancer de la prostate et du cancer du sein. Il a été rapporté davantage que les CLA inhibent le facteur d'hypoxie sous les conditions hypoxiques au niveau des lignées cellulaires dans le carcinome hépatocellulaire humain (Yamasaki et al., 2012).

I.3.4.2. CLA et obésité

La supplémentation par l'isomère T10, c12-CLA réduit la masse grasse corporelle chez plusieurs modèles animaux, tels que la souris (Kim et al., 2010; Moon et al., 2009; Rosberg-Cody et al., 2011), le rat (Gilbert et al., 2011 ; Martins et al., 2012; Romero-Sarmiento et al., 2012) , le porc (Fernandez-Figares et al., 2012) et les humains (Druart et al., 2014; Kennedy et al., 2010; Racine et al., 2010).

Une alimentation contenant du CLA de long terme a conduit à une lipodystrophie marquée par une perte complète du tissu adipeux brun, à une réduction du niveau de leptine, une accumulation de graisse dans le foie et une insulino-résistance (Rubin et al., 2012 ; Shen et al., 2013). Une alimentation de T10,c12-CLA a été associée à une induction d'apoptose dans les cultures pré-adipocytaires et les tissus adipeux blanc et brun en raison du TNF alpha et du désaccouplement de la protéine -2 (UCP-2) (Moon et al., 2015).

L'alimentation contenant l'isomère T10, c12- CLA inhibe la transcription de l'enzyme impliquée dans la synthèse du novo d'acide gras, la désaturation de l'acide gras et la formation du triglycéride (Ma et al., 2014). Des études sur l'effet des CLA sur la réduction du poids corporel ont impliqué des personnes saines recevant (1.8g CLA / jour), des personnes affichant un surpoids, et des obèses (1.7– 6.8 g CLA/jour) pendant 12 semaines. Les résultats ont montré une réduction significative de la masse grasse (4%) sans changement au niveau du poids corporel. Comme il a été démontré que les CLA réduisent le tissu adipeux, le poids corporel et le niveau de leptine chez l'homme (Yang et al., 2015 ; Miranda et al., 2014).

I.3.4.3. CLA et inflammation

Il a été rapporté que les isomères de CLA exhibent des propriétés anti-inflammatoires in vivo et dans les cultures cellulaires par l'inhibition de COX-2 ; ce qui conduit à une diminution de la libération de PGE2 et à la production des cytokines pro-inflammatoires. Le CLA active le PPARy dans certaines lignées cellulaires (Borniquel et al.,

2012; Kim et al., 2011) et améliore la production d'immunoglobulines de protection, IgA, IgG et IgM, tout en réduisant la production des IgE (Yang et al., 2015).

En outre, une étude récente sur les humains a montré que l'isomère c9, t11 dans le beurre a exercé des effets immunomodulateurs chez les jeunes adultes en bonne santé et a réduit la production des biomarqueurs pro-inflammatoires associés au surpoids et à l'obésité (Penedo et al., 2013).

Les CLA exercent leur effet sur la réponse inflammatoire par trois mécanismes : ils diminuent la genèse des eicosanoïdes inductibles impliqués dans la réponse anti-inflammatoire, y compris les prostaglandines et les leucotriènes ; ils interagissent avec le PPARs. et inactivent le signal de la transduction du NF- (facteur nucléaire chaîne légère kappa activateur des cellules activées) (Miranda et al., 2014) .

I.3.4.4. CLA et diabète

Le CLA alimentaire a montré un pouvoir de restaurer la sensibilité à l'insuline, réduit la glycémie et l'insulinémie chez les rats diabétiques fa/fa, normalise l'intolérance au glucose, augmente le niveau des adiponectines plasmatiques chez le rat Zucker diabétique (Castro Web et al., 2012), améliore la sensibilité à l'insuline chez les jeunes humains (Castro-Webb et al, 2012;. Rubin et al, 2012.). Cependant, ces effets pourraient être spécifiques aux isomères (Halade, Rahman, et Fernandes, 2010).

En outre, il a été rapporté que le CLA régule la prise alimentaire en réduisant la sécrétion de leptine chez les rats, les souris non diabétiques, et les humains atteints du diabète de type 2 par le biais de la signalisation hypothalamique (Norris et al., 2009).

I.3.4.5. CLA et athérosclérose

La supplémentation alimentaire avec le CLA induit la résolution de l'athérosclérose à des niveaux aussi faibles que 0,1% de l'alimentation. Un taux de supplémentation en CLA de 1% abolie totalement l'athérosclérose chez le modèle de souris ApoE KO. La mixture de CLA et les isomères individuels affichent une réduction de lésions d'athérosclérose, les lipoprotéines plasmatiques et les inflammations locales chez les lapins, les souris et les hamsters (Yang et al., 2014).

Dans les études chez l'homme, le CLA semble améliorer le profil lipidique plasmatique chez les sujets obèses, les diabétiques et les normo-lipidiques avec une réduction de la triglycéridémie, la cholestérolémie et la lipoprotéïnémie (Liang et al., 2011).

I.3.4.6. CLA et effet antimicrobien

L'acide linoléique est reconnu susceptible d'inhiber la croissance des bactéries productrices de CLA (Kim et al., 2000; cités par Song et al., 2005). Il a été suggéré que les acides gras exercent leur action antimicrobienne sur la membrane cytoplasmique.

Par conséquent, l'activité antimicrobienne de l'acide linoléique est l'une des difficultés dans le développement à grande échelle du processus de la production de CLA (Lee et al., 2003 ; cité par Song et al., 2005) ; étant donné qu'une concentration élevée en acide linoléique ou des conditions de culture aérobiques inhibent la biohydrogénation de l'acide linoléique (Kim et al., 2000; cités par Xu et al., 2004).

I.3.4.7. CLA et composition corporelle

Les CLA sont capables de modifier la composition corporelle des individus, en augmentant la masse maigre au détriment de la graisse (Palmquist . 1998). Cette variation peut être sans effet sur le poids vif (Miner et al., 2001) ou entraîner une perte de poids (Rahman et al., 2001), et peut s'accompagner d'une diminution de l'ingéré (Miner et al., 2001) ou pas (Delany et al., 1999) .

Ces effets remarquables et potentiellement utilisables dans la lutte contre l'obésité ont été démontrés sur diverses espèces animales : souris (Ohnuki et al., 2001), rat et poulet (Doyle, 1998) , lapin (Corino et al., 2002) , porcelet (Ostrowska et al., 1991) , agneau (Mir et al., 2000) ; mais restent encore très discutés chez l'homme.

L'isomère CLA responsable de cette propriété anti-graisse serait le t10c12-CLA (Park et Pariza , 2001). Certaines études ont mis en évidence une diminution du taux de graisse corporelle chez des hommes en bonne santé après ingestion de CLA (Smedman et Vessby , 2001) ; alors que d'autres n'ont décelé aucun effet significatif (Zambel et al., 2000 ; Kreider et al., 2002).

En fait, chez l'homme, les effets d'une supplémentation en CLA sont très variables selon les individus et en général de faible amplitude. De surcroît, la plupart de ces études ont utilisé des doses plus faibles que celles utilisées chez les animaux (en moyenne 27 mg / kg poids vif chez l'homme contre 240 mg / kg poids vif chez le porc par exemple) (West, 1998).

En outre, de nombreux facteurs peuvent interférer avec cette propriété métabolique des CLA : c'est le cas de la teneur en graisses et de la composition de la ration en acides gras différents des CLA (Stangl, 2000), de l'espèce (par exemple, le hamster répond mieux que le rat) (Kim, 2002), de l'état physiologique (Stangl, 2000) ou pathologique du sujet (des

patients humains atteints de diabète sucré de type 2 (Belury et al., 2003) ou obèses (Riserus et al., 2001), répondent à une supplémentation en CLA par une réduction significative de leur masse grasseuse), et du type de culture cellulaire utilisé (cellules primaires ou clones cellulaires) (McNeel et al., 2003).

En revanche, l'apport de CLA ne préviendrait pas la reprise de poids suite à un régime chez l'homme (Miner et al., 2001) ou chez des rats obèses ayant perdu 20 % de leur poids suite à un régime restrictif (Buisso et al., 2001). L'action « anti-graisse » des CLA s'exercerait essentiellement dans le foie et le tissu adipeux blanc, mais pas dans le tissu adipeux brun (Yamasak et al., 1999).

Ainsi, les CLA auraient une action préventive sur l'obésité, mais ne permettraient pas de la combattre une fois installée. Enfin, Poulos et al. (2001) ont mis en évidence chez le rat que la réponse à une supplémentation en CLA serait dépendante du sexe (baisse de la graisse chez la femelle et augmentation du muscle chez le mâle), de l'âge et de la durée de cette supplémentation.

I.3.4.8. CLA et croissance

Les CLA modulent également la croissance du jeune. Des rates supplémentées en CLA durant la gestation et la lactation ont donné naissance à des petits ayant des poids plus élevés et une croissance post-natale plus rapide que celle des animaux témoins (Whigham et al., 2000). Cet effet sur la croissance serait plutôt dû à l'isomère *c9t11*-CLA (Pariza et al., 2001).

Chez les poussins et les jeunes rats (Doyle, 1998), les CLA amplifient la croissance osseuse en induisant la synthèse du facteur de croissance insuline-like (IGF) et en contrôlant la production locale des prostaglandines. En effet, à fortes concentrations, la prostaglandine E2 réprime localement la synthèse des protéines osseuses. Les CLA accélèrent donc la construction osseuse en réduisant considérablement la production de prostaglandines.

I.3.5. Mécanismes d'action des CLA.

I.3.5.1. Action des CLA sur le métabolisme lipidique et sur la dépense énergétique

L'action « anti-graisse » des CLA repose sur l'orientation du métabolisme lipidique vers l'utilisation périphérique des lipides à des fins énergétiques. En effet, plusieurs enzymes et protéines impliquées dans la lipogenèse ou dans le transport et la distribution des acides gras d'origine exogène ou synthétisés *de novo* dans le foie sont réprimées sous l'action des CLA.

C'est le cas de l'acétylCoA carboxylase dans le foie et le tissu adipeux (Corino et al., 2002), la sterylCoA désaturase dans le foie (Park et al., 2000), l'acide gras synthétase, la LPB (Lipid Binding Protein) dans les adipocytes (Kang et al., 2003) pour la lipogénèse et de la lipoprotéine lipase (Park et al., 2001), de l'apolipoprotéine B (Yotsumoto et al., 1999), et des VLDL (Stangl, 2000) pour les protéines de transport.

À l'opposé, la lipomobilisation des acides gras stockés dans les adipocytes serait amplifiée par activation des lipases tissulaires (Whigham et al., 2000) qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides en glycérol et acides gras exportés dans la circulation générale. De même, la carnitine palmitoyl transférase serait activée et favorise le transfert dans les mitochondries des acides gras en vue de leur dégradation par la β -oxydation.

Ainsi, les CLA entraînent une augmentation de la dépense énergétique, en maintenant notamment un quotient respiratoire bas la nuit, lié à l'oxydation accrue des graisses, associée à une augmentation significative de la consommation d'oxygène (Ohnuk et al., 2001). Les animaux ayant reçu des CLA continuent à brûler des graisses la nuit pendant que les témoins oxydent plutôt des glucides (Durgam et al., 1997). Ces différents travaux ont démontré que les CLA étaient capables de réduire les graisses corporelles par divers mécanismes, incluant la diminution de l'énergie ingérée, l'augmentation du catabolisme lipidique, et une inversion dans le combustible nocturne.

I.3.5.2. Action des CLA sur la différenciation et la prolifération adipocytaire

La réduction des graisses corporelles observée lors d'une supplémentation alimentaire en CLA, pourrait aussi être attribuée à l'inhibition de la prolifération (Evans et al., 2000) et de la différenciation des pré-adipocytes (Kang et al., 2003). Alors que le *c9c12-C18:2* est considéré comme un puissant inducteur de la différenciation des fibroblastes en adipocytes, les CLA, de configurations proches du *c9c12-C18:2*, joueraient le rôle d'antagonistes dans la différenciation adipocytaire (Mir et al., 2000).

De plus, (Miner et al., 2001) ont montré que la diminution du nombre d'adipocytes pourrait résulter de l'action apoptogène des CLA. Néanmoins, la réduction de la taille des bourrelets graisseux induite par les CLA, pourrait également être due à une diminution de la taille des adipocytes (Azain et al., 2000).

Par ailleurs, (Corino et al., 2002) ont noté une augmentation des concentrations plasmatiques de leptine chez des lapins recevant une ration enrichie en CLA. Comme la leptine intervient dans le contrôle de l'obésité en régulant le centre nerveux de la satiété, elle

participerait à l'action « anti-obésité » des CLA. Mais d'autres études (Tsuboyama et al., 2000 ; Yamasak et al., 2000) ont à l'inverse noté une diminution des concentrations circulantes de leptine ainsi que dans le tissu adipeux : comme les CLA réduisent le nombre des adipocytes, il s'ensuit une diminution de la production de leptine, sécrétée par les adipocytes.

I.3.5.3. Action des CLA sur le métabolisme glucidique et propriétés antidiabétiques

Les variations des concentrations circulantes de leptine réguleraient la sécrétion pancréatique d'insuline. Ainsi une diminution de la concentration plasmatique de leptine pourrait être à l'origine de l'hyperinsulinémie provoquée par l'ingestion de CLA chez la souris tsuboyama. L'administration de CLA induit également chez les rats prédiabétiques (Stangl et al., 1999) ou diabétiques (Houseknecht et al., 1998) une élévation de l'insulinémie et renforce les effets hypoglycémisants de cette hormone en augmentant très significativement la capture musculaire du glucose circulant (Henriksen et al., 2003).

Ainsi, en participant à la régulation de la production insulinoïque et en favorisant l'utilisation périphérique du glucose, notamment par les muscles, les CLA pourraient être utilisés dans le traitement des diabètes sucrés insulino-dépendants en phase d'installation, et dans la prévention des diabètes sucrés non insulino-dépendants ou insulino-résistants (type 2 du diabète sucré).

Dans ces derniers cas, on observe, en effet, une hyperglycémie chronique due à une utilisation tissulaire insuffisante du glucose. Ce trouble primaire est en général observé sur des sujets obèses dont les cellules, musculaires en particulier, présentent un nombre insuffisant de récepteurs membranaires à l'insuline suite à une modification de la composition en acides gras des phospholipidiques membranaires ; ce qui réduit considérablement la capture périphérique du glucose.

Cette hyperglycémie chronique conduit à une stimulation pancréatique permanente provoquant une sécrétion accrue et continue d'insuline, se traduisant par une hyperinsulinémie. Mais en raison de l'incapacité des cibles cellulaires à utiliser le glucose, l'hormone circulante reste inefficace. Or, en raison de la promotion de la capture musculaire du glucose, et de leurs propriétés « anti-obésité » les CLA participent à la restauration de l'efficacité hormonale même si parallèlement, ils renforcent le statut hyperinsulinique du sujet (Clement et al., 2002).

Que Henriksen et al. (2003) aient attribué ce rôle anti-diabétique à l'isomère *t10c12*, ce serait plutôt l'isomère *c9t11* qui en serait responsable. En effet, plusieurs études ont montré que l'isomère *t10c12* présentait au contraire des effets hyperglycémiantes susceptibles de renforcer, voire de déclencher un état d'insulinorésistance (Tsuboyama et al 2003)

Chapitre II

**Bioconversion de L'Acide
Linoléique par des Souches
Probiotiques In Vitro**

CHAPITRE II : Bioconversion de l'Acide Linoléique par des Souches Probiotiques *In Vitro*.

II.2. Résumé

L'objectif de cette étude consiste à déterminer la capacité de deux souches probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 à produire des isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA) *in vitro*. Le pouvoir acidifiant et la croissance bactérienne ont été mesurés après 24h de culture sur un milieu MRS additionné de 0.5mg/mL d'acide linoléique libre. Les lipides des surnageants bactériens ont été extraits puis méthylés pour l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) afin de quantifier et qualifier les isomères de CLA produits. Les résultats obtenus ont montré que les deux souches affichent une bonne croissance et une activité acidifiante normale. L'analyse CPG a montré que les souches étaient capables de convertir l'acide linoléique en ses isomères conjugués. Les CLA produits consistent en un mélange de *cis*-9, *trans*-11-octadécadiénoïque; *trans*-10, *cis*-12 octadécadiénoïque; et *trans*-9,*trans*-11-octadécadiénoïque (c9t11, t10c12, t9t11). Le pouvoir de conversion de l'acide linoléique par *Lactobacillus rhamnosus* LBRE- LSAS s'est révélé plus élevé que celui de *Bifidobacterium animalis* subsp *Lactis* Bb12.

Mots clés: bactéries probiotiques, acide linoléique, acide linoléique conjugué (CLA), Bioconversion.

II.1. Abstract

The aim of this study is to underscore the ability of two probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* Bb12 to produce conjugated linoleic acid isomers (CLA) *in vitro*. Acidifying activity and growth of the strains were measured after 24h of culture in 0.5mg/mL free linoleic acid added MRS broth. The bacterial supernatants were methylated and extracted for gas chromatography analysis (GC) to quantify and qualify the produced CLA isomers. The obtained results have shown that both strains exhibit a normal growth and acidifying activity. GC analysis showed that the strains were able to convert linoleic acid into its conjugated isomers. The produced CLA consist of a mixture of *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic; *trans*-10, *cis*-12 octadecadienoic; and *trans*-9, *trans*-11-octadecadienoic (c9t11, t10c12, t9t11). Linoleic acid bioconversion power of *Lactobacillus rhamnosus* LBRE- LSAS was higher than that of *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12.

Key words : probiotic bacteria, linoleic acid, conjugated linoleic acid isomers (CLA), Bioconversion.

II.3. Introduction

Malgré le caractère souche-dépendant de leurs effets, les probiotiques sont fonctionnels s'ils sont administrés oralement à une dose quotidienne de 10^9 UFC (Oshea et al., 2012).

Les probiotiques interagissent avec les cellules épithéliales intestinales directement par certains constituants cellulaires comme l'ADN, les acides lipoteichoïques et les polysaccharides présents sur les surfaces cellulaires, mais aussi indirectement via la production des métabolites bioactifs comme certains acides gras tels que les isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA).

Les isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA) sont produits naturellement par l'isomérisation de l'acide linoléique dans le rumen grâce à l'activité d'enzymes isomérasés des bactéries comme celles sécrétées par la souche *Butyrivibrio fibriosolvens* (Wallace et al., 2007). Certaines souches propioniques (*Propionibacterium*) et lactiques acides ont la capacité de convertir l'acide linoléique en CLA pendant les fermentations laitières (Henessey et al., 2007).

Contrairement aux ruminants, aucun taux significatif de CLA produit à partir de l'acide linoléique (LA) n'a été détecté chez l'homme (Lee et al., 2006). L'apport de CLA chez l'homme devrait être assuré principalement par l'alimentation ou à défaut ou en complément par l'activité de la flore intestinale ou de probiotiques ajoutés qui transforment l'acide linoléique alimentaire en ses isomères conjugués.

Dans cette optique d'assurance de l'apport d'isomères conjugués de l'acide linoléique à l'organisme par une voie alternative à celle de l'alimentation, nous allons, dans ce chapitre, explorer le pouvoir de production de CLA *in vitro* de deux souches sélectionnées pour leurs aptitudes probiotiques, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12.

II.4. Matériels et Méthodes

II.4.1. Souches, milieux de culture et réactifs.

- **Souches utilisées :**
 - *Lactobacillus rhamnosus* : souche expérimentale LBRE-LSAS provenant de la collection du laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et

de la santé (LMBAFS, Université de Mostaganem) où elle a été isolée à partir de selles de bébés en bonne santé et ne recevant aucune antibiothérapie, nourris exclusivement au sein et âgés de 2 à 3 semaines.

- ***Bifidobacterium animalis subsp. lactis*** : souche probiotique de référence, connue commercialement sous la désignation Bb-12 (Chr. Hansen, Hørsholm, Denmark).

- **Acide linoléique**

L'acide linoléique (AL, L1012: linoleic acid for culture) utilisé dans cette étude est de Sigma-France de pureté > 99%.

- **Tween 80**

Le Tween 80 utilisé (polyoxyéthylène-sorbitan-mono-oléate) provient de chez Fluka (France).

- **Thioglycolate de sodium**

Agent réducteur de potentiel red-ox a été utilisé à la concentration finale de 2% (P/V).

- **Les milieux de culture**

Bouillon MRS: Le bouillon MRS : De Man, Rogosa et Sharpe (De Man et al., 1960), référence (Merck, VM 10661) est utilisé pour la réactivation des souches LBRE-LSAS et Bb12 (Annexe 1).

MRS cystéiné : Il s'agit du milieu MRS précédemment cité, additionné de 20 g/L d'agar-agar et de chlorure de cystéine à 0.05%, réparti dans des flacons et autoclavé 15 min à 121°C. Il a été utilisé pour le dénombrement des souches LBRE-LSAS et Bb12 (Annexe 1).

II.4.2. Culture des souches probiotiques.

II.4.2.1. Repiquage et revivification

Les souches conservées à 4°C sont réactivées et maintenues vivantes par trois repiquages successifs de 200µl d'inoculum dans 10 mL de milieu de croissance spécifique pour chaque souche, puis incubées à 37°C pendant 24h.

II.4.2.2. Ajustement de l'inoculum

L'ajustement de l'inoculum s'effectue à l'aide d'une cellule de Thoma. La formule de dénombrement est la suivante :

$$N = X \cdot 4 \cdot 10^6 \text{ cellules/ml.}$$

N : nombre de cellules dans 1 mL

X : nombre de cellules dénombrées dans un carré.

II.4.2.3. Pouvoir fermentaire des souches bénéfiques sur milieu MRS en présence de l'acide linoléique

- Distribuer le MRS préparé préalablement dans des tubes stériles.
- Ajouter 0.5 mL de culture bactérienne jeune à raison d'une concentration finale de $1 \cdot 10^7$ - $5 \cdot 10^7$ cellules/mL.
- Ajouter 0.5mL de thioglycolate de sodium de concentration finale de 2% (p/v).
- Ajouter 0.5mL d'acide linoléique d'une concentration finale de 0.5mg/mL préalablement dissout dans une solution stérile de tween 80 à 0.05% (Alonso et al., 2003).
- Incuber pendant 24h en anaérobiose à 37°C (bougie + Anaérocult).
- Evaluer le pouvoir fermentaire des souches bactériennes après 24h d'incubation.

Remarque :

Des témoins ont été préparés dans les mêmes conditions sans inoculation bactérienne et/ou acide linoléique.

II.4. 2. 4. Détermination de la biomasse après 24h d'incubation

- La biomasse est déterminée par ensemencement en surface de 100µL sur milieu approprié de la dilution adéquate.
- Le nombre de cellules viables, déterminé 2 fois, est calculé à partir de colonies appropriées obtenues après incubation sur milieu spécifique à la souche considérée et est exprimé en log UFC/mL.
- Les dilutions décimales permettant le dénombrement seront réalisées dans la solution de dilution simple (DS).

II.4.2.5. Mesure de pH

La mesure des valeurs de pH a été réalisée avec un pH-mètre digital (wtw, pH-mètre330, Weilheim; Allemagne) après 24h d'incubation en anaérobiose à 37°C.

II.4.3. Détermination des CLA issus de la conversion bactérienne de l'acide linoéique.

Les isomères de CLA produits ont été quantifiés dans les surnageants bactériens (culots écartés), car il s'avère que ceux sont seulement les isomères largués qui peuvent être

systématiquement disponibles pour exercer une probable activité positive, et que le maximum de cette productivité bactérienne en CLA pourrait être obtenue après 24h de culture (Alonso et al., 2003). C'est pour cela qu'après 24h d'incubation, les cultures sont centrifugées à 23500 xg pendant 10 min/5°C et les lipides sont extraits à partir des surnageants bactériens et méthylés selon le protocole de Jenkins (2010).

Tous les produits chimiques utilisés dans cette procédure sont de haute qualité analytique et sont fournis par Sigma-Aldrich (France), sauf indication particulière.

II.4.3.1. Extraction et méthylation

Les acides gras (AG) des surnageants bactériens sont tout d'abord extraits et méthylés en une seule étape selon la méthode de Jenkins (2010), modifiée par le remplacement de la solution de trifluorure de bore (BF_3) à 14% (P/V) dans du méthanol par une solution de chlorure d'acétyle (CH_3COCl) dans du méthanol (10:1 V/V). Les extraits méthyliques d'acides gras sont additionnés de 0,8mg d'un étalon interne (C19:0), afin de réaliser leur dosage par CPG. Cette méthode repose sur une double méthylation : en milieu basique pour les TG et en milieu acide pour les AG libres, les phospholipides et les esters de cholestérol. Par ailleurs, cette méthode permet de minimiser l'isomérisation des CLA, inévitable lors de l'extraction-méthylation.

II.4.3.1.1. Extraction-méthylation des acides gras (Jenkins, 2010)

La procédure de l'extraction-méthylation passe par les étapes suivantes :

- Peser 20 mg de matière grasse dans un tube en verre pyrex de 20mL.
- Ajouter 200 μL de dichlorométhane (CH_2Cl_2), 200 μL d'acide nonadécanoïque (C19:0) (4mg/mL de CH_2Cl_2) et 2ml de methanolate de sodium (CH_3ONa) à 2% préparées extemporanément, puis fermer hermétiquement le tube avec un bouchon téflon.
- Bien mélanger le contenu au vortex pendant 1min minimum, le chauffer 10min à 90°C dans un bain thermostaté, avant de le laisser refroidir à température ambiante.
- Ajouter 3mL de solution de chlorure d'acétyle (CH_3COCl) à 5% (V/V) préparée extemporanément, bien agiter pendant 1min minimum, puis mettre le tube à chauffer à 80°C pendant 10 min dans un bain thermostaté, refroidir-à température ambiante.
- Ajouter 5mL d'eau ultra-pure et 1.6 mL d'hexane, puis bien mélanger pendant 5min au culbuteur et centrifuger 10min à 4000xg. Récupérer la phase supérieure hexanoïque (2ml) renfermant les esters méthyliques d'AG pour analyse en CPG.

II.4.3.1.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse

L'identification et la quantification des AG ainsi extraits et méthylés et contenus dans les 2mL d'hexane sont réalisées par CPG (Agilent 6890N, Network GC System, USA), équipé d'un auto-injecteur (7693, Network GC System, USA), d'une colonne 88% cyanopropyl-aryl polysiloxane de 100m (0.25mm ID, 0.20mm d'épaisseur de film, CP-Sil 88, Chrompack- Varian, Netherlands) et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID).

Les chromatogrammes obtenus sont traités à l'aide du logiciel d'exploitation Peak Simple (Peak Simple Chromatography Data System, version 3.56, SRI Inc., USA). Les pics des chromatogrammes sont identifiés et quantifiés à partir de standards commerciaux, excepté les trans-C18:1 autres que t9- et t11-C18:1 et les cis-C18:1 autres que c9-C18:1 qui ont été identifiés par ordre d'élution.

II.4.4. Traitement statistique des résultats

Chaque expérience a été indépendamment répétée trois fois dans un dispositif en randomisation totale et les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse de variance (ANOVA) en utilisant le logiciel STATBOX pro (Version 6.40, pro). La comparaison des moyennes a été réalisée par le test de Student-Newman-Keuls au seuil de 5% pour comparaison multiple. La différence est considérée significative à $P < 0.05$.

II.5. Résultats et discussion

II.5.1. Pouvoir fermentaire des souches bénéfiques sur milieu MRS en présence d'acide linoléique.

Les résultats relatifs au pouvoir de développement des souches bactériennes sur milieu MRS additionné d'acide linoléique à une concentration finale de $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, sont reportés dans la figure 7 qui représente les valeurs de la biomasse accumulée ($\text{Log UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$) et le tableau 12 qui illustre le pouvoir acidifiant des cultures après 24heures d'incubation à 37C° en anaérobiose.

II.5.1.1. Biomasse accumulée

Après 24 h d'incubation, les deux souches cultivées sur MRS ont affiché une croissance moins importante ($p < 0.05$) en présence d'acide linoléique libre dans le milieu par rapport aux témoins (en absence d'acide linoléique). Ainsi, l'acide linoléique inhibe quelque peu la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* et de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis*.

La croissance maximale enregistrée est de l'ordre de 7.9 et 8.6 log CFU/mL ($p < 0.05$) pour les souches *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. lactis* Bb12, respectivement ; alors que ces même souches ont affiché une croissance plus élevée après 24h d'incubation sur milieu MRS en absence d'acide linoléique. Cette diminution de la croissance reste, cependant, faible puisqu'elle est de l'ordre de 0.8 et 1.3 unité Log ($p < 0.05$) pour les deux souches, respectivement.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Rogriguez-Alcala et al. (2011), qui avaient montré que l'acide linoléique ajouté au milieu à 0.1% ne provoquait pas un effet négatif important sur la croissance de *B. animalis* (Bb12-1, BLC).

Une autre étude, celle de Florence et al. (2014), montre que la présence de l'acide linoléique dans le milieu n'affecte pas la croissance des souches probiotiques bifides comme *B. animalis* subsp. *lactis* (Bb12, B94 and B104). En outre, les travaux de Gorissen et al. (2012) montrent que les souches probiotiques de *B. bifidum*, *B. breve*, *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* ont une très bonne capacité de croître sur milieu MRS en présence de 0.5 mg/mL d'acide linoléique et de le fermenter en métabolites secondaires.

Par ailleurs, Villar-Tajadura et al. (2014) ont observé une inhibition des performances de croissance des souches lactiques en présence d'acide linoléique libre à des concentrations supérieures à 1.5 mg/mL.

De manière générale, l'acide linoléique possède une activité antimicrobienne qui peut altérer la perméabilité des membranes plasmiques de certaines bactéries de Gram+ (Villar-Tajadura et al., 2014).

Certains acides gras polyinsaturés, ainsi que l'acide linoléique, ont un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne. Le mécanisme exact n'est pas encore bien connu.

Néanmoins, il semblerait que la diffusion d'acides gras à travers la membrane entraîne des difficultés chimiosmotiques chez la bactérie ; ce qui perturbe son potentiel ou déconnecte ses voies intra-membranaires (Gorissen et al., 2015).

Sosa-Castañeda et al. (2015) ont rapporté que 13 souches de *Lactobacillus* ont affiché des taux importants de viabilité et de croissance sur milieu MRS additionné de 2% d'acide linoléique.

Des études plus récentes de Ozer et al. (2016) et Hur et al. (2016) rapportent que différentes souches de *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* et *Propionibacteria* sont capables de survivre et de croître en présence d'acide linoléique.

II.5.1.2. Pouvoir acidifiant des souches bactériennes en présence de l'acide linoléique

Les valeurs exprimant l'effet de l'acide linoléique (additionné à 0.5%) sur l'activité acidifiante des deux souches estimée par la mesure du pH de cultures de 24h sur milieu MRS en anaérobiose à 37°C sont reportées au tableau 12.

Après 24h d'incubation en anaérobiose dans le milieu MRS additionné de 0.5% d'acide linoléique, les valeurs de pH obtenues suite à l'activité de l'une ou l'autre des souches utilisées ont montré une diminution par rapport aux valeurs pH des témoins (sans souches et/ou sans acide linoléique : pH = 6.2 en moyenne).

Elles étaient plutôt acides et représentaient 4.5 chez *L. rhamnosus* et 4.6 chez *B. lactis*. L'absence d'acide linoléique dans le milieu MRS n'a pas notablement modifié ces valeurs de pH qui demeurent égales à 4.5 et 4.3 pour *L. rhamnosus* et *B. lactis* Bb12, respectivement.

Ainsi l'effet de l'acide linoléique sur l'activité acidifiante des souches n'est pas très important chez *B. lactis* Bb12 (chute de 0.3 unités pH), voire inexistant chez la deuxième souche *L. rhamnosus*.

Ces résultats sont en étroite corrélation avec ceux de Wang et al. (2015) qui attribuent aux probiotiques cette capacité de biosynthèse d'acides organiques (lactate, acétate, formate) *In Vitro*.

Ce pouvoir de croissance et d'activité acidifiante des probiotiques en présence de 0.5mg/mL d'acide linoléique a, également, été rapporté par Gorissen et al. (2012) avec les souches de *B. bifidum*, *B. breve* et de *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum*

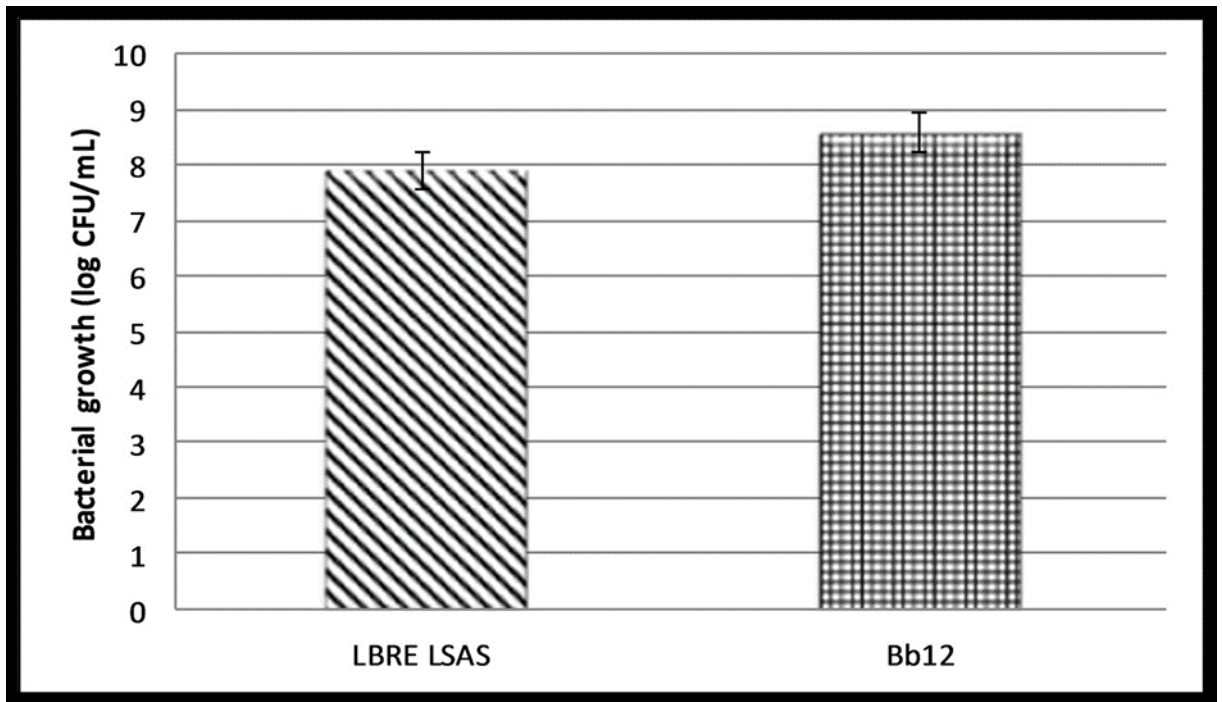


Figure 7 : Biomasse accumulée (Log UFC/mL) après 24h de monoculture à 37C° en anaérobiose de *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. lactis* Bb12 sur milieu MRS additionné de 0.5mg/mL d'acide linoélique. Les valeurs représentent la moyenne « m » de trois expériences indépendantes \pm SD

Tableau 12 : Activité acidifiante des souches testées exprimée en termes de pH après 24h d'incubation à 37C° sur MRS en présence ou en absence d'acide linoléique (LA).

Milieu	MRS-LA		MRS	
Souches	LBRE-LSAS	Bb12	LBRE-LSAS	Bb12
pH [#]	4.5 \pm 0,1 ^{a,b}	4.6 \pm 0,1 ^a	4.5 \pm 0,1 ^{a,b}	4.3 \pm 0,1 ^b

Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes \pm SD.

a, b: Groupes homogènes selon le test de Newman-Keuls avec risque d'erreur $p < 0,05$.

II.5.2. Production bactérienne de CLA *in vitro*

Dans ce protocole, les souches ont été évaluées pour leur capacité à convertir l'acide linoléique libre en ses isomères conjugués (CLA). L'analyse chromatographique en phase gazeuse (CPG) a montré que les deux souches étudiées ont la capacité de convertir l'acide linoléique (LA) libre en différents taux de ses isomères c9, t11-CLA, t10, c12-CLA, t11, c15-CLA and t9, t11 ($p < 0.05$) (tableau 13).

La souche candidate au statut probiotique, *L. rhamnosus* LBRE-LSAS, présente la meilleure capacité de conversion de l'acide linoléique (44.46%) en ses isomères CLA qui représentent 0.135 mg /mL et dont l'isomère t11, c15-CLA en est majoritaire, suivi de l'isomère c9, t11-CLA.

Quant à la souche à statut probiotique reconnu, *B. animalis* Bb12, elle a montré une capacité de conversion plus faible, puisque seulement 11,73% d'acide linoléique libre a été converti en 0,074 mg / mL d'isomères de CLA. Les principaux isomères produits sont l'isomère c15-CLA suivi des isomères t10, c12-CLA, puis c9, t11-CLA.

Dans l'étude de Gorissen et al. (2012), il est démontré qu'un bon pouvoir de conversion de l'acide linoléique en CLA n'est pas forcément lié à un pouvoir fermentaire élevé. Ces auteurs ont remarqué que des espèces bifides (*B. breve*) avaient affiché une production assez importante en CLA bien que la biomasse qu'elles accumulent en présence d'acide linoléique soit faible. Nos résultats vont dans le même sens que ces observations.

La capacité bactérienne de convertir l'acide linoléique en ses isomères CLA dépend de l'activité de la linoléate isomérase (Farmani et al., 2010) qui a été trouvée chez des souches du genre *Lactobacillus*. Il semblerait que l'activité de cette enzyme dépend des souches bactériennes (Gorissen et al., 2015).

La conversion de l'acide linoléique en CLA se fait naturellement dans le rumen durant la biohydrogénation de cet acide (Coakley et al., 2003). Cependant, certaines souches probiotiques peuvent produire les isomères de CLA à partir de l'acide linoléique libre présent dans le milieu (Abd El-Salam et al., 2010).

Seiber et al. (2004) ont rapporté que de nombreuses souches de *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus* sont capables de produire du CLA à partir de l'acide linoléique. Toutefois, la formation de CLA est étroitement liée, non seulement, à la quantité d'acide linoléique dans le milieu, mais aussi à la concentration et au type de souche bactérienne.

Alonso et al. (2003) ont rapporté que deux cultures de *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei*, étaient capables de convertir l'acide linoléique en CLA. Il en est de même pour Lee et al. (2007) qui ont testé plusieurs souches pour cette propriété et ont observé que les souches *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbruechii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Streptococcus salivarius*, *Bifidobacterium breve*, et *Bifidobacterium dentium* peuvent convertir l'acide linoléique en CLA.

Par ailleurs, des souches de *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, et *Bifidobacterium pseudolongum* produisent à la fois les acides linoléiques conjugués (CLA) et les acides linoléiques conjugués (CLNA) *in vitro* à partir de l'acide linoléique et l'acide α -linoléique. respectivement (Gorissen et al., 2010).

O'Shea et al. (2012) ont analysé 30 souches typiques de la flore intestinale et ont trouvé que *Bifidobacterium breve* et *Propionibacterium* produisent une gamme d'isomères CLA.

En revanche, il a été discerné que certaines souches de *Lactobacillus*, *Butyrivibrio fibrisolvens* et *Clostridium*, comme les espèces de *Roseburia*, métabolisent l'acide linoléique en acide vaccénique ou en acide gras hydroxylé (10-OH-18: 1).

Le phénomène de conversion de l'acide linoléique en CLA n'est pas clairement expliqué, et on ne sait toujours pas pourquoi les souches de *Lactobacilli* comme *L. plantarum*, par exemple, sont considérées comme meilleurs producteurs de CLA. Tandis que d'autres souches n'affichent aucun taux significatif de production de CLA. Cette conversion pourrait fonctionner comme un mécanisme de détoxification bactérienne (Hur et al., 2016).

Tableau 13 : Production bactérienne de CLA (mg/mL) *in vitro* après 24h d'incubation sur milieu MRS-LA (0.5mg/mL) à 37C°

Acide gras et CLA sur milieu MRS (mg /mL)						
Souches	CLA totaux	t10c12 CLA	c9t11 CLA	t11c15 CLA	c9,c11 CLA	T9,t11 CLA
<i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS	0.135 ^b	1.047.10 ⁻³	1.064.10 ⁻³	2.435.10 ⁻³	ND	ND
<i>B. lactis</i> Bb12	0.074 ^a	0.7.10 ⁻³	0.6.10 ⁻³	2.10 ⁻³	ND	ND

a, b: Groupes homogènes selon le test de Newman-Keuls avec risque d'erreur p <0,05.

II.6. Conclusion

L'objectif de la présente étude était d'explorer le pouvoir de deux souches probiotiques à convertir l'acide linoléique libre en ses isomères conjugués CLA. Dans ce sens, le pouvoir bactérien de bioconversion a été calculé à partir des profils en acides gras largués dans les surnageants des cultures MRS additionnées de linoléate.

Sur le plan de la croissance des souches testées, nous pouvons conclure que l'acide linoléique utilisé à une concentration finale de 0.5 mg/mL ne perturbe pas le développement de ces bactéries.

Par ailleurs, l'activité de synthèse d'acides organiques des souches testées en présence de l'acide linoléique est plus intense par rapport à celles des cultures témoins (absence d'acide linoléique). Ceci indique que les souches testées tolèrent l'acide linoléique.

L'analyse CPG des profils en acides gras issus de cette bioconversion bactérienne de l'acide linoléique, a révélé que les souches probiotiques étudiées étaient capables de produire les CLA dans le milieu MRS après 24 h de fermentation. Cette activité de bioconversion a aussi produit d'autres acides gras qui sont en étroite relation avec les voies génératrices de CLA.

Chapitre III
Effets des Isomères
Bactériens de L'Acide
Linoléique Conjugué (CLA)
chez des Rats Wistar à
Obésité Nutri-Induite par
un Régime Hyper-Gras

Chapitre III : Effets des Isomères Bactériens de L'Acide Linoléique Conjugué (CLA) chez des Rats Wistar à Obésité Nutri-Induite par un Régime Hyper-Gras

III.1. Résumé

La présente étude vise la mise-en évidence de l'effet anti-obésité des isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA) issus de la bioconversion bactérienne de l'acide linoléique par les souches *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12. Ces souches ont été administrées aux rats Wistar nourris avec un régime hyper-gras (High-Fat Diet ou HFD) ou avec un régime standard (SD) supplémenté ou non avec de l'acide linoléique (n=7 par groupe, 8 semaines d'expérimentation). La préservation du pouvoir des souches à produire des CLA a été vérifiée. Leur pouvoir d'implantation dans le tube digestif des rats, ainsi que leurs effets sur le poids corporel et les paramètres biochimiques plasmatiques en réponse à l'obésité induite par le régime hyper-gras ont, également, été explorés. Les résultats de l'analyse chromatographique CPG obtenus montrent que ces souches ont la capacité de produire les différents isomères CLA *in vivo*. Par ailleurs, l'effet anti-obésité chez les rats des groupes HFD ayant reçu les souches bactériennes a été observé avec la souche *L. rhamnosus* LBRE-LSAS qui a produit l'isomère connu par son effet anti-obésité (trans-10, cis-12-CLA). Il est probable que d'autres isomères CLA pourraient être impliqués dans cet effet anti-obésité.

Mots clés : *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS - *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12- Acide linoléique conjugué- Régime hyper-gras - Obésité.

III.2. Abstract

The present study was undertaken to assess the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid isomers (CLA) derived from *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 bioconversion of linoleic acid. These strains were administered to Wistar rats fed a High-Fat diet (HFD) or a standard diet, with or without linoleic acid supplementation (n= 7 per group, 8 weeks of experiment). The preservation of the *in vivo* CLA producing capacity of these strains was confirmed. Their ability to colonize rat intestine, and to affect body weight and serum biochemical parameters in response to HFD-induced obesity, were also explored. Obtained results showed that the two strains were able to produce CLA isomers *in vivo* as demonstrated by gas chromatography analysis. Besides, the expression of the anti-obesity effect in all HFD given bacteria rats was only observed with *L. rhamnosus* LBRE-LSAS which produced the defined anti-obesity isomer (i.e. the trans-10, cis-12-CLA). It is likely that others CLA isomers could be involved in this anti-obesity effect.

Key words: *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS - *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12- Conjugated linoleic acid- High fat diet - Obesity.

III.3. Introduction

Les isomères conjugués de l'acide linoélique (CLA) comprennent un groupe d'isomères positionnels et géométriques de diécanoïques conjugués dérivés de l'acide linoélique (Song et al., 2016).

Il a été montré que les isomères de CLA possèdent plusieurs effets biologiques y compris des effets anti-cancérogène, anti-obésité, antioxydants et anti-inflammatoires (Kim et al., 2016). Ils sont présents d'une façon naturelle généralement dans les produits d'origine animale ; particulièrement, les produits des ruminants qui représentent la source la plus riche en CLA, y compris l'acide ruménique (Alfaia et al., 2016).

En effet, les CLA sont générés à partir de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique alimentaire. Par conséquent, la viande de ruminants représente la principale source de CLA pour l'alimentation humaine (Hur et al., 2016). En outre, de nombreuses études ont révélé que les CLA diététiques peuvent augmenter leurs concentrations chez les animaux monogastriques et la volaille (Kang et Kim, 2016).

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les bactéries probiotiques possèdent la capacité de convertir l'acide linoléique en CLA *in vitro* et *in vivo* (Sornplang et Piyadeatsoontorn, 2016). Cependant l'effet anti-obésité des CLA bactériens n'a été investigué que par une seule étude de Lee et al. (2006) qui a démontré qu'une souche d'origine humaine *Lactobacillus rhamnosus* PL60 est capable de produire des CLA qui exercent un effet anti-obésité chez les souris.

Ainsi, dans la présente étude, deux souches probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 ont été évaluées pour leur capacité à produire des CLA *in vivo*, dont l'effet anti-obésité a été investigué chez des rats Wistar nourris avec un régime hyper-gras (HFD).

III.4. Matériels et méthodes

III.4.1. Matériels

III.1.4.1. Souches bactériennes

Les deux souches lactiques, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, utilisées dans cette expérience sont décrites au chapitre II de cette thèse (se référer au II.4.1. page 44).

III.1.4.2. L'Acide linoélique

L'acide linoléique utilisé est celui décrit au chapitre II paragraphe II.4.1. page 45 de ce manuscrit.

III.1.4.3. Modèle animal utilisé

Des rats Wistar mâles adultes âgés de 5 à 6 semaines et fournis par l'Institut Pasteur d'Alger ont été utilisés dans cette expérimentation. Leurs poids corporel moyen est de 150 ± 20 g.

III.1.4.4. Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés sont le bouillon MRS et le MRS cystéiné pour la réactivation et le dénombrement des souches probiotiques ; ainsi que le BHI pour la vérification de la non translocation de ces souches vers d'autres organes (se référer au chapitre II paragraphe II.4.1. page 45 de ce manuscrit).

III.4.2. Méthodes

III.4.2.1. Traitement des animaux

Les cages métaboliques abritant les rats ont été placées dans des conditions favorables d'élevage à un cycle de lumière/ obscurité de 12 h, une température constante à 25°C et un taux d'humidité de $55 \pm 10\%$. L'accès à la nourriture et à l'eau était ad libitum. L'éthique générale d'utilisation des animaux de laboratoire a été respectée (ECRA/AIBUM).

Après deux semaines d'adaptation pour stabiliser les conditions métaboliques avec un régime standard commercial, les rats ont été répartis en sept lots ($n=7$), dont six recevaient un régime hyper-gras (HFD), alors que le septième lot recevait un régime standard (Régime Standard ou Standard Diet ou SD) pendant 8 semaines d'expérimentation.

Parmi les six groupes soumis au régime HFD, quatre recevaient oralement chaque jour la souche LBRE-LSAS ou Bb12 dans une solution de PBS stérilisée (tampon salin de phosphate) à une concentration cellulaire de 1×10^9 UFC par rat. Parmi ces quatre groupes, il y en a deux qui ont reçu de l'acide linoléique à une concentration de 1.4% (V/V) (rats traités). Les deux derniers groupes restants n'ayant reçu aucune souche bactérienne, recevaient une solution de PBS stérilisée (témoin négatif AL) ou 1,4% d'acide linoléique (témoin positif AL). Cette mise en lots des rats est illustrée dans le tableau 14.

III.4.2.2. Composition des régimes

Deux types de régimes ont été utilisés dans cette expérimentation, un régime hyper-gras (High Fat Diet ou HFD) et un régime standard (Standard diet ou SD). Sur le plan calorifique, le régime HFD est composé de 47.2% de lipides, 35.1% de glucides et de 17.6% de protéines (4.79 cal/g) ; alors que le régime SD est composé de 11% de lipides, 65% de glucides et de 24% de protéines (3.55 cal/g). La composition des régimes est présentée dans le tableau 15. Afin de suivre leur évolution pondérale, les rats étaient pesés deux fois par semaine.

III.4.2.4. Implantation des souches dans le tube digestif des rats

Les crottes des animaux de chaque lot ont été collectées à des intervalles de 24 h dans des tubes stériles, puis des dilutions adéquates ont étéensemencées sur milieu MRS additionné de 2% (P/V) de thioglycolate de sodium et 0.002% (V/V) de bleu de bromophénol en présence de vancomycine (30µg/ mL) dans des conditions anaérobiques sous la hotte. Les boîtes de pétri ont été incubées en anaérobiose pendant 72h à 37°C°.

III.4.2.5. Production de CLA *in vivo*

Pour déterminer la capacité des souches étudiées à convertir l'acide linoléique en CLA *in vivo*, les crottes des animaux des lots recevant les souches ont été récupérées, les souches bactériennes ont été isolées sur milieu MRS additionné de thioglycolate de sodium et de vancomycine puis inoculées sur milieu MRS additionné d'acide linoléique (0.5 mg/mL) pour être incubées pendant 24h à 37°C°. Une fois la culture terminée, les CLA ont été extraits et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions opératoires indiquées précédemment (se référer au II.4.3. pages 46 à 48).

III.4.2.6. Sacrifice des animaux, récupération du sang et des organes

À la fin des 8 semaines d'expérimentation, les animaux ont été anesthésiés au chloroforme puis sacrifiés après 12h de jeûne. Les organes (foie, rate, reins, tissu adipeux blanc ou WAT tissu adipeux mésentérique ou MAT) ont été excisés, rincés à l'eau physiologique et pesés. Le sang prélevé et les organes récupérés ont été conservés à – 80°C jusqu'à leur analyse.

III.4.2.7. Test de translocation bactérienne

Le foie et la rate de chaque rat de l'expérience ont été collectés dans des boîtes de pétri stériles, broyés avant d'être dilués. Des dilutions adéquates ont étéensemencées sur des milieux BHI et MRS puis incubées pendant 72h à 37°C. Par ailleurs, des aliquotes de 15µL de

sang ont été prélevés et ensemencés directement sur milieux MRS et BHI puis incubés pendant 72h à 37C°.

Tableau 14 : Mise en lots, régimes et traitement des rats de l'expérience.

Les lots	Régimes et traitement
Lot 1	Régime hyper-gras + 10 ⁹ UFC/mL de souche <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS dans une solution de PBS stérile
Lot 2	Régime hyper-gras +10 ⁹ UFC/mL de souche <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS dans solution de 1.4% d'acide linoléique
Lot 3	Régime hyper-gras +10 ⁹ UFC/mL Souche <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb12 dans solution de PBS stérile
Lot 4	Régime hyper- gras +10 ⁹ UFC/mL Souche <i>Bifidobacterium animalis</i> Bb12 dans solution de 1.4 % d'acide linoléique
Lot 5	Régime hyper- gras + 1.4% d'acide linoléique (témoin positif AL)
Lot 6	Régime hyper- gras +solution de PBS stérile (témoin négatif AL)
Lot 7	Régime standard + solution de PBS stérile

Tableau 15 : Composition des régimes utilisés dans l'expérimentation

Ingrédients	Régime standard (SD) (g/kg)	Régime hyper-gras (HFD) (g/Kg)
Caséines	18	200
Lactose	263	355
Farine de maïs	390	167
Graisse du mouton	/	209,4
Cellulose	50	50
D/ L Méthionine	3	3,6
L Cystine	1,8	2,1
Bitartrate de choline	2.5	2,9
CMV	10	10
Energie (Kcal/kg)	3550,3	4791,6

III.4.2.8. Détermination des paramètres biochimiques

Afin de vérifier l'état de l'homéostasie glucidique et lipidique, la glycémie, la cholestérolémie (TC), la triglycéridémie (TG) et le cholestérol des lipoprotéines de haute densité (C-HDL) ont été déterminés par des méthodes enzymatiques colorimétriques (Spinreact, Sant Esteve De Bas, Espagne ; Kit Biolabo, Maizy, France).

Le dosage du glucose plasmatique est réalisé par une méthode enzymatique colorimétrique (Kit SPINREACT). En présence de la glucose-oxydase, le glucose est oxydé en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier, en présence de la peroxydase et du phénol, oxyde un chromogène (4-aminoantipyrine) incolore en un colorant rouge à structure quinonéimine. L'absorption est mesurée à 505 nm et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose.

La réaction de dosage du cholestérol consiste à libérer le cholestérol de la liaison ester par la cholestérol-estérase et d'oxyder le cholestérol libre non estérifié par la cholestérol-oxydase. L'indicateur est une quinonéimine formée à partir de peroxyde d'hydrogène, de la 4-aminophénazone, sous l'action catalytique de la peroxydase. La concentration en quinonéimine colorée est mesurée à 505 nm. Elle est proportionnelle à la concentration en cholestérol total présent dans l'échantillon

Le cholestérol des lipoprotéines de faible densité (C-LDL) est obtenu par calcul selon la formule de Friedwald (**valable si les TG sont inférieurs à 3,5 g/l soit 4mmol/l** : $C-LDL = CT - [C-HDL + TG/5]$).

Les triglycérides sont dosés après leur hydrolyse enzymatique par une lipase en glycérol et acides gras libres. L'indicateur est une quinonéimine formée à partir de peroxyde d'hydrogène, de la 4- aminoantipyrine et du 4-chlorophénol sous l'action catalytique de la peroxydase. L'intensité de la couleur de la quinonéimine est mesurée à $\lambda = 500\text{nm}$ et sera proportionnelle à la concentration en triglycérides de l'échantillon.

Les concentrations plasmatiques de leptine ont été déterminées en utilisant des kits ELISA pour rat (EZRL-83K, Merck Millipore, Darmstadt, Allemagne). Ce dosage est basé sur une réaction immuno-enzymatique en sandwich en phase solide. Les microplaques sont recouvertes avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène spécifique de la molécule Leptine. Un aliquot de l'échantillon contenant la leptine endogène est incubé dans un puits avec l'enzyme conjuguée, c'est-à-dire un anticorps anti-Leptine conjugué avec la peroxidase de Raifort

(horseradish peroxidase, HRP). Après incubation, le conjugué non lié est éliminé durant le lavage des puits. La quantité de conjugué-HRP liée est proportionnelle à la concentration de leptine contenue dans l'échantillon. Suite à l'addition de solution substrat, l'intensité de la coloration obtenue est proportionnelle à la concentration de leptine contenue dans l'échantillon.

III.4.2.9. Traitement statistique des résultats

Ces résultats ont fait l'objet du même traitement statistique que celui indiqué au chapitre II (se référer au chapitre II paragraphe II.4.4. page 48 de ce manuscrit).

III.5. Résultats et discussion

III.5.1. Implantation des souches dans le tube digestif des rats et translocation bactérienne

Les résultats relatifs à l'implantation de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 dans le tube digestif des rats est illustrée par la figure 8. Après 96h de gavage des rats, la viabilité *In Vivo* des deux bactéries a été estimée par la biomasse accumulée et qui correspond à des niveaux de l'ordre de 6.5 log UFC/g pour *L. rhamnosus* et 5.1 log UFC/g pour *B. animalis*.

Ces résultats montrent que les deux souches sont capables de s'implanter dans le tube digestif des rats.

Cette propriété est essentielle car elle constitue un préalable au processus d'adhésion des cellules bactériennes à l'épithélium intestinal permettant ainsi à ces bactéries d'exprimer leurs propriétés probiotiques chez l'hôte (Kaushik et al., 2009).

Nos résultats sont en accord avec les observations de De champs et al. (2003) et de Lee et al. (2006) qui ont démontré la capacité de certaines souches lactiques productrices de CLA d'adhérer aux intestins de l'hôte. Selon Sosa-Castañeda et al. (2015), l'implantation des bactéries probiotiques est un facteur déterminant de leur potentiel de bioconversion de l'acide linoléique en CLA.

Partant du principe de la non translocation des souches probiotiques, il a été procédé à la vérification de ce principe pour les deux souches utilisées dans cette expérience. Les observations faites indiquent l'absence totale de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 dans le sang et le foie des rats. Ceci laisse penser que les deux souches administrées demeurent dans les intestins.

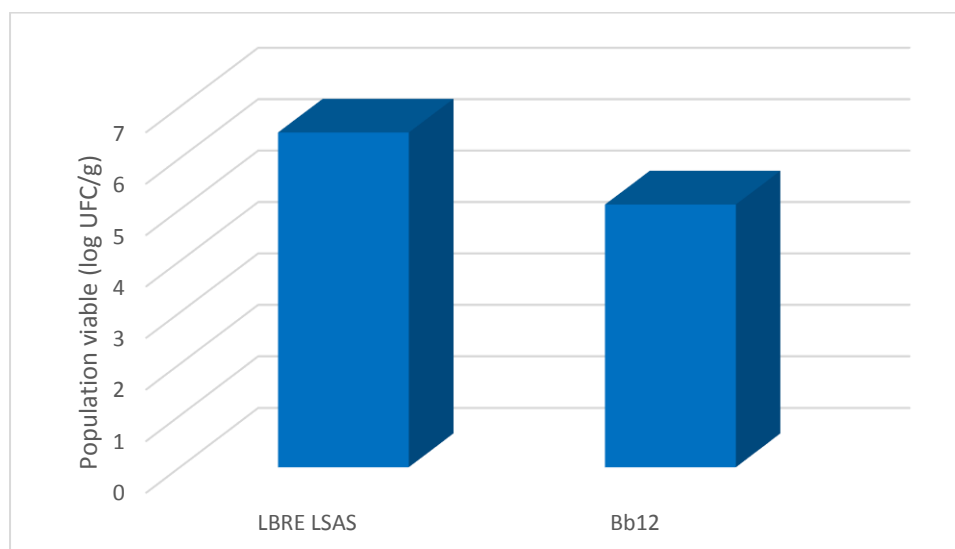


Figure 8 : Implantation de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (exprimée en terme de population viable en log UFC/mL dans le tube digestif de rats Wistar à obésité nutri-induite et gavés 96h avec 10^9 UFC de l'une ou l'autre de ces souches. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm écart type (n = 3).

III.5.2. Production de CLA *in vivo* par les souches

La production de CLA *in vivo* a été évaluée dans le but de vérifier si les souches maintenaient leur capacité de convertir l'acide linoléique au niveau de l'intestin. Les résultats relatifs à cette production sont illustrés dans le tableau 16.

L'analyse CPG a montré que *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12-ont préservé leur pouvoir de produire les CLA à partir de l'acide linoléique *in vivo*.

Suite à l'administration de ces deux souches, une augmentation significative ($p < 0,05$) des quantités de CLA a été détectée au niveau des crottes des rats traités ($6,4 \times 10^{-2}$ mg/mL et $9,4 \times 10^{-2}$ mg/mL respectivement) par rapport aux groupes témoins non traités (8×10^{-3} mg/mL).

Ces résultats sont analogues à ceux obtenus par Ewaschuk et al. (2006), qui ont observé que le taux de conversion de l'acide linoléique en CLA s'est accru après l'ingestion de microorganismes connus pour leur pouvoir de conversion de l'acide linoléique en CLA chez la souris.

En outre, Fakuda et al. (2006) avaient rapporté que l'administration de la souche probiotique MDT-5, qui a une intense capacité de produire les CLA, aux souris a induit une remarquable augmentation de l'accumulation des CLA. Par ailleurs, il a été remarqué que l'administration orale de cette souche entraîne une élévation de la teneur en CLA des graisses corporelles; ce qui démontre que ces CLA peuvent être absorbés par le gros intestin (Hur et al., 2016).

Wall et al. (2009) ont montré que l'administration orale quotidienne de 90mg d'acide linoléique et d'une concentration de 1×10^9 UFC/mL de *Bifidobacterium breve* pendant 8 semaines se traduit par une augmentation de la concentration de l'isomère C9, t11-CLA dans le foie, le gros intestin et les fèces des souris BALB / c saines. Cette augmentation représente plus de 2 fois celle du groupe témoin traité par l'acide linoléique seul.

De même, une augmentation de l'isomère c9, t11 CLA de l'ordre de 1.5 fois celle du témoin a été observée dans le foie de porc ayant reçu une combinaison d'huile de tournesol contenant 63% d'acide linoléique et une dose de 1×10^{10} UFC/mL de la souche *Bifidobacterium breve* d'une façon quotidienne pendant 21 jours (Wall et al., 2009)

III.5.3. Gain pondéral, poids des organes et paramètres sériques biochimiques.

Les résultats relatifs à l'évolution pondérale au cours de l'expérimentation sont présentés à la figure 9. Avant de commencer les régimes, les poids des rats des différents groupes ont été standardisés. Les différences de poids corporel des rats entre les groupes n'ont été observées qu'à partir de la troisième semaine de régime (10.11 à 13.55 % pour les rats des groupes HFD- bactéries ; 5.61 à 18.25% pour les rats des groupes HFD-LA-bactéries ; 13.22 à 14.85% pour les rats HFD témoins ; 24.11% pour les rats du groupe SD). Après la sixième semaine d'expérimentation, les différences de poids corporel des rats des différents lots ont été significativement plus prononcées ($p < 0.05$).

En effet, l'augmentation du poids corporel était associée à un dépôt de masse grasse au niveau du tissu adipeux chez le groupe soumis au régime HFD ($p < 0.05$; fig.9) où les valeurs enregistrées étaient deux fois supérieures à celles enregistrées chez les témoins (les rats des groupes HFD avaient des poids 35% plus lourds que les rats des groupes SD). A vrai dire, après 8 semaines de son administration, le régime hyper-gras, a entraîné un gain de poids significatif ($p < 0.05$) chez les rats (fig.9C).

Selon ces résultats, les rats dont l'obésité était nutri-induite consommaient 1.4 fois plus d'énergie que les rats nourris avec un régime standard (la prise énergétique totale par rat était de 5647.6 ± 55.88 kcal pour le groupe SD ; 8074.08 ± 78.91 kcal pour le groupe témoin HFD, 7277.2 ± 98.36 kcal pour les groupes HFD-bactéries, 7491.68 ± 89.22 kcal pour les groupes HFD-AL, et 7323.12 ± 69.25 kcal pour les groupes HFD-bactéries-AL).

Les rats sous régime HFD sont devenus nettement obèses après 6 semaines. Si ce régime est maintenu jusqu'à 8 semaines, le gain de poids devient plus significatif ($p < 0.05$) par rapport au témoin soumis à un régime standard.

Les gains pondéraux étaient à l'ordre de 78.9 et 86.9 g pour les rats recevant les souches *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. lactis* Bb12 respectivement (figure 9A) ; alors que ceux mesurés chez les rats des lots recevant à la fois ces souches et l'acide linoléique étaient plus faibles (55.4g pour LBRE-LSAS et 58.16g pour la Bb12) (fig.9B).

L'effet des CLA sur la réduction du gain pondéral a été expliqué par la mise en œuvre de plusieurs mécanismes tels que l'augmentation de la dépense énergétique, la modulation du métabolisme adipocytaire, la modulation des adipokines et des cytokines et l'augmentation de la β -oxydation des acides gras (Kostogryns et Pisulewski, 2010).

Les résultats des poids des organes sont présentés à la figure 10. On n'a observé aucune différence significative dans le poids ($p > 0.05$) de certains organes tels que la rate, le rein et le cerveau des groupes expérimentaux ; considérant que le poids du tissu adipeux blanc et mésentérique était inférieur chez les rats recevant des bactéries ou avec ou sans la supplémentation d'acide linoléique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lee et al. (2006).

Tableau 16 : Production bactérienne de CLA (mg/mL) *in Vitro* après 24h d'incubation sur milieu MRS-additionné d'acide linoléique (0.5mg/ mL) à 37C°

Souches	Acide gras sur milieu MRS (mg /ml)					
	CLA totaux	t10c12 CLA	c9t11 CLA	t11c15 CLA	c9,c11 CLA	t9,t11 CLA
<i>L. rhamnosus</i> LBRE-LSAS	0.064 ^b	5.7.10 ⁻³	4.8.10 ⁻³	ND	ND	4.47. 10 ⁻³
<i>B.lactis</i> Bb12	0.094 ^a	ND	6.31.10 ⁻³	1.8.10 ⁻³	ND	0.5.10 ⁻³

a, b : Groupes homogènes selon le test de Newman-Keuls avec risque d'erreur p <0.05

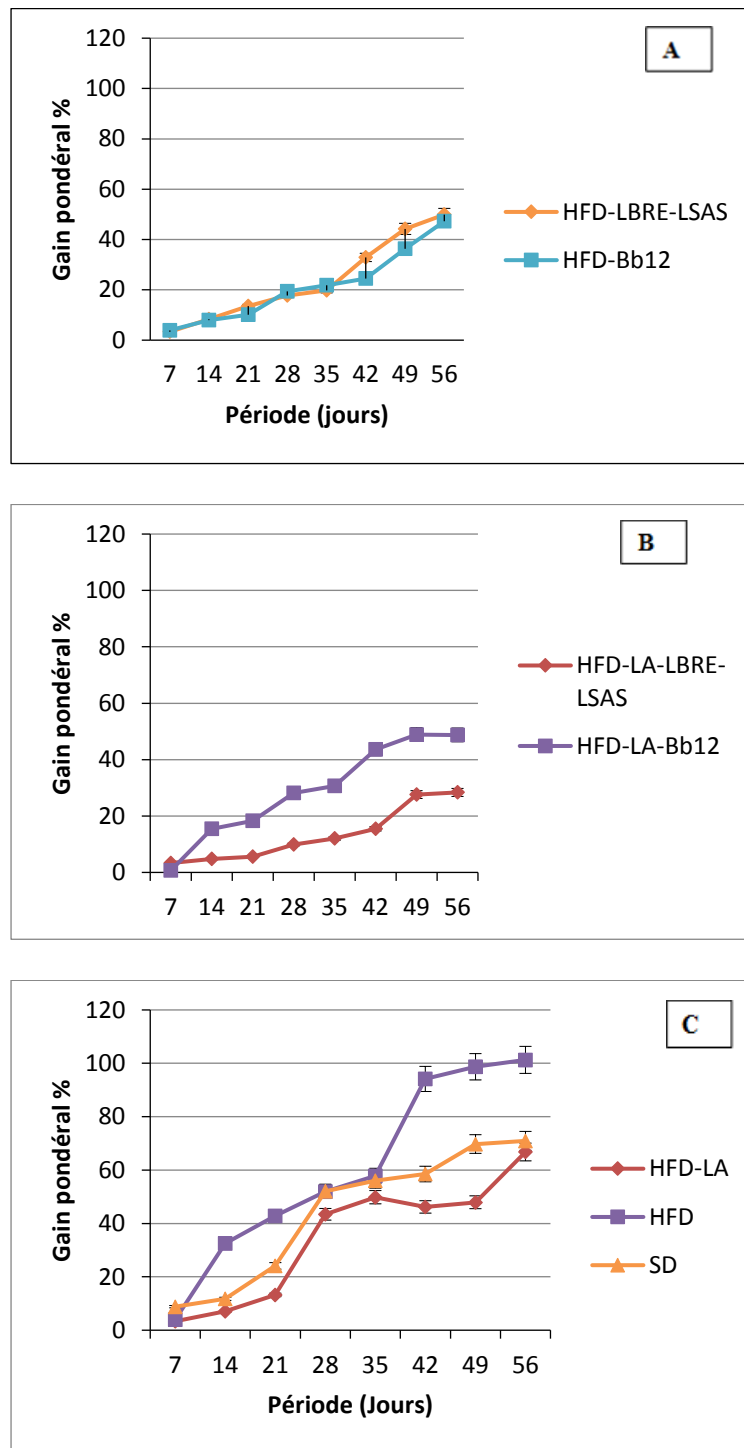


Figure 9: Effet « souches » (9A) ou « souches+ acide linoléique » (9B) sur le gain de poids (en %) des rats Wistar à obésité nutri-induite (HFD) comparés aux rats Wistar témoins (9C). Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm écart type (n = 3).

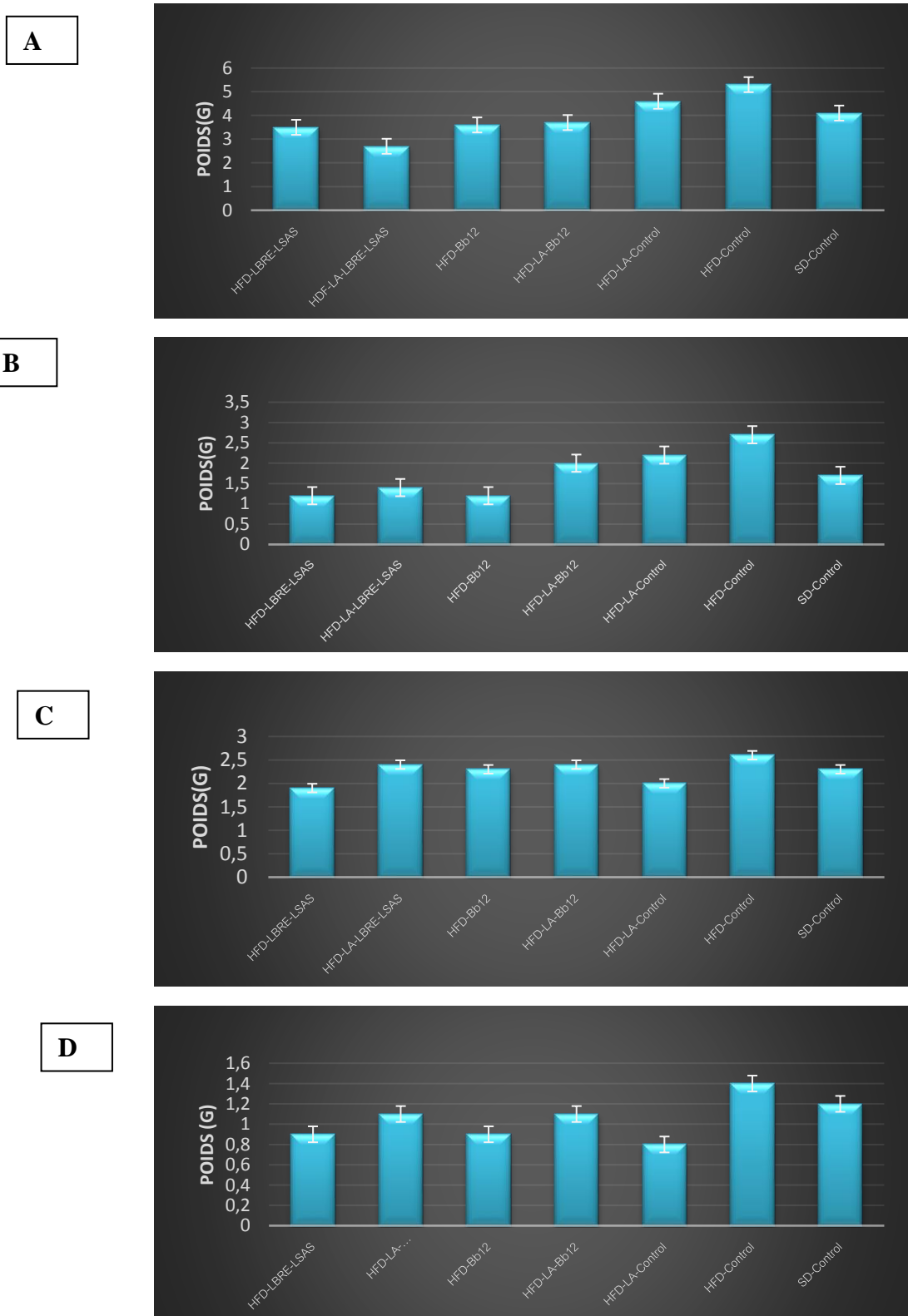


Figure 10 : Effet « régime HFD », « HFD+souche », « HFD+ acide linoléique » ou « HFD+ souche+acide linoléique » sur le poids (en g) du tissu adipeux blanc (A), du tissu adipeux mésentérique (B), des reins (C) et de la rate (D) par rapport au régime témoin (SD après 8 semaines d'expérimentation. Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm écart type (n = 3).

Les taux sérique de glucose, C-HDL, C-LDL, CT et de TG des lots expérimentaux sont reportés dans le tableau 17. Aucun changement de ces paramètres n'a été observé chez les rats recevant le régime standard; alors qu'ils augmentent significativement ($p < 0.05$) plus chez les rats à obésité nutri-induite (HFD) que chez les mêmes rats ayant reçu l'une de souches *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS ou *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12, l'acide linoléique ou la combinaison des deux.

Par ailleurs, la triglycéridémie était élevée chez les rats à obésité nutri-induite HFD non traités par les souches bactériennes ($p < 0.05$). Il n'y a donc pas d'effet « souche » ou « souche+ acide linoléique » ou encore « acide linoléique » sur l'hypertriglycéridémie provoquée par le régime hyper-gras ou HFD.

En revanche, nous avons observé un effet « souche » qui s'est manifesté chez les rats à obésité nutri-induite (HFD) ayant reçu l'une ou l'autre des deux souches de cette expérience avec ou sans acide linoléique, par une réduction significative ($p < 0.05$) de la glycémie qui est passé de 1.25 à une tranche de valeur située entre 0.8-1.02 g/L en comparaison avec les rats ayant reçu un régime standard (glycémie = 0.99g/L).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Lee et al. (2006) qui révèlent que l'administration d'une souche lactique productrice de CLA semble normaliser les taux des paramètres biochimiques et de leptine chez des souris nourries d'un régime hyper-gras.

Par ailleurs, ces résultats confirment que l'administration des souches testées, supplémentées ou non de l'acide linoélique, améliore le profil lipidique des rats nourris avec un régime hyper-gras. En plus de la capacité hypocholestérolémiante des probiotiques et de leur pouvoir de régulation du taux de lipides circulants, les CLA ont été désignés capables de réparer les dyslipidémies, l'adiposité, le dépôt lipidique ectopique, l'insulinorésistance et l'intolérance au glucose (Malinska et al., 2015).

Tableau 17 : Paramètres biochimiques plasmatiques des lots expérimentaux

	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6	Lot 7
Glycémie (g/L)	0.81±0.01 ^f	0.86±0.01 ^e	0.91±0.01 ^d	1.03±0.01 ^b	0.62±0.01 ^g	1.25±0.01 ^a	0.99±0.01 ^c
TC (mmol/L)	1.65±0.01 ^b	1.65±0 ^b	0.54±0.01 ^f	0.59±0.01 ^e	0.69±0.01 ^d	2.32±0.01 ^a	1.10±0 ^c
TG (mmol/L)	1.23±0.01 ^a	1.04±0.586 ^b	1.34±0.01 ^a	1.31±0.01 ^a	1.25±0.01 ^a	1.77±0.01 ^a	1.50±0.015 ^a
HDL-C (mmol/L)	1.47±0.01 ^d	1.45±0.01 ^e	1.27±0.01 ^f	1.45±0.01 ^e	1.88±0.006 ^b	1.99±0.01 ^a	1.70±0.01 ^c
LDL-C (mmol/L)	0.39±0.01 ^e	0.50±0.01 ^{a,b}	0.41±0.01 ^d	0.49±0.01 ^b	0.51±0.01 ^{a,b}	0.44±0.01 ^c	0.52±0.01 ^a
Leptine (ng/mL)	3.50±0.12 ^g	3.99±0.25 ^f	4.31±0.41 ^e	4.44±0.12 ^d	5.01±0.37 ^b	4.55±0.10 ^c	22.11±0.14 ^a

a, b : Groupes homogènes selon le test de Newman-Keuls avec risque d'erreur $p < 0$

III.6. Conclusion

L'objectif de la présente étude était de mettre en évidence le pouvoir anti-obésité de deux souches probiotiques productrices de CLA, en l'occurrence *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. lactis* Bb12, chez des rats Wistar soumis à un régime hyper-gras.

Le protocole exécuté a permis, d'abord, de montrer le pouvoir des souches de convertir *InVivo* l'acide linoléique en ses isomères conjugués ou CLA ; et ensuite de démontrer leur effet anti-obésité.

Les résultats obtenus ont révélé que les deux souches étudiées ont préservé leur capacité productrice des isomères CLA après leur implantation dans le tube digestif des rats.

L'administration orale de ces souches et de l'acide linoléique a démontré un effet sur la réduction du gain pondéral des rats traités, ainsi que le poids de leur tissus adipeux. En outre, les taux plasmatiques en glucose, TC, TG, HDL-C, LDL-C et leptine des animaux traités semblent être optimisés. Les CLA produits semblent être impliqués dans les effets révélés par les souches étudiées.

Chapitre IV :
Effets des Isomères
Bactériens de l'Acide
Linoléique Conjugué(CLA)
sur les Tissus Hépatique et
Adipeux des Rats Wistar à
Obésité Nutri-Induite par un
Régime Hyper-Gras.

Chapitre IV : Effets des Isomères Bactériens de l'Acide Linoléique Conjugué (CLA) sur les Tissus Hépatique et Adipeux des Rats Wistar à Obésité Nutri-Induite par un Régime Hyper-Gras.

IV.1. Résumé

Cette étude explore les effets des isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA) produits par deux souches probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (une bactérie d'origine humaine) et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (une bactérie de référence) sur les tissus hépatique et adipeux des rats Wistar à obésité nutri-induite par un régime hyper-gras. Des rats Wistar mâles âgés de 5 semaines ont été divisés en 4 lots (n=7/lot), dont 3 recevaient un régime hyper-gras (un lot témoin, et deux lots recevant 1×10^9 UFC de la souche LBRE-LSAS ou Bb12 supplémentée de 1.4% d'acide linoléique libre; désignés comme des rats traités), et un quatrième lot recevait un régime standard. Après 8 semaines d'expérimentation, les rats ont été anesthésiés par le chloroforme puis sacrifiés. Le foie et le tissu adipeux de chaque lot de rats ont été recueillis pour les analyses biochimiques et histologiques. Les résultats obtenus montrent que le foie des rats traités soumis au régime hyper-gras n'a pas développé de stéatose hépatique comme ce fut le cas des rats du lot non traité soumis au même régime (témoin). Le profil lipidique (triglycérides et cholestérol) du foie et du tissu adipeux des rats traités a été remédié, spécialement chez les rats traités par *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS. Ces résultats montrent que les souches productrices de CLA, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 ont une forte capacité de modulation du métabolisme lipidique et de prévention de stéatose hépatique chez les rats obèses.

Mots-clés: Obésité nutri-induite-Régime hyper-gras-Acide linoléique conjugué-Stéatose hépatique-Tissu adipeux-Profil lipidique.

IV.2.. Abstract

The aim of the present study is to background the effect of conjugated linoleic acid isomers (CLA) produced by two probiotic strains, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (a human originated bacterium) and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (a reference strain), on both hepatic and adipose tissues of high-fat diet fed Wistar rats. Five-week-old male Wistar rats were divided into 4 groups (n=6/group) fed a high-fat diet for three of them (control and supplemented with 1×10^9 CFU per rat of LBRE-LSAS or Bb12 strain and 1.4% of free linoleic acid; designed as treated rats) and a standard diet for the fourth group. After 8 weeks of experimental period, rats were sacrificed after chloroform anesthesia; liver and adipose tissues of each group were excised for biochemical and histological analyses. Obtained results showed that livers of treated high-fat diet fed rats did not exhibit a hepatic steatosis like those of untreated high-fat diet fed rats (control group) did. Lipid profile (triglycerides and total cholesterol) of the liver and the adipose tissue was markedly improved in treated rat groups, especially in LBRE-LSAS strain given high-fat diet rats. Such results strongly support the occurrence of the bacterial power of *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 to modulate lipid metabolism and to avoid steatosis in diet-induced model of obesity in rat.

Key-words: Diet-induced model of obesity, High-Fat Diet, Conjugated Linoleic Acid, Hepatic steatosis, Adipose tissue, Lipid profile.

IV.3. Introduction

L'obésité est connue comme un trouble nutritionnel métabolique impliquant un déséquilibre énergétique chronique dû à un apport calorique élevé et à une réduction des dépenses énergétiques (Gao et al., 2015).

En raison des complications qui lui sont liées ; comme la dyslipidémie athérogène, la résistance à l'insuline, le diabète sucré de type 2, le syndrome métabolique et la maladie du foie gras non alcoolique (NAFLD = Non Alcoholic Fat Liver Disease) ; l'obésité est devenue un défi santé majeur dans le monde.

La NAFLD induite par un régime hyper-gras, commence par une stéatose hépatique simple définie par une accumulation excessive de graisses, essentiellement sous forme de triglycérides (TG) dans le cytoplasme des hépatocytes, résultant d'une interaction complexe entre l'alimentation, le système métabolique et les réponses de l'hôte au niveau du tissu adipeux, du muscle, du pancréas et du foie (Matherly et Puri, 2012). La stéatose hépatique peut progresser vers une stéatohépatite non alcoolique (HNS) plus sévère, une fibrose hépatique, une cirrhose et même un carcinome hépatocellulaire (HCC) (Cohen et al., 2011).

En outre, la fibrose du tissu adipeux est une caractéristique importante des anomalies du tissu adipeux, elle est étroitement liée à l'adiposité chez la souris et l'humain (Pessin et Kwon, 2012).

Bien que l'expansion adipocytaire soit essentielle pour le stockage des graisses, les matrices extracellulaires rigides (ECM) entourant les adipocytes peuvent provoquer une fibrose locale et une inflammation (Divoux et al., 2010).

Même si les conséquences métaboliques de la fibrose du tissu adipeux ne sont pas bien élucidées, une étude récente a révélé que la fibrose peut être une cause ou un résultat d'une inflammation du tissu adipeux induite par l'obésité (Sun et al., 2013).

Il n'existe actuellement aucune thérapie pharmacologique spécifique pour la NAFLD. Cependant, la modification du mode de vie comme la réduction du poids, l'alimentation saine et l'exercice physique demeure la seule approche établie (Valenti et al., 2013).

Par ailleurs, les CLA d'origine laitière, considérés comme de potentiels régulateurs du métabolisme énergétique, ont montré leurs effets bénéfiques sur la remédiation de la stéatose hépatique (Vyas et al., 2012) et la réduction du volume adipocytaire (Hu et al., 2012).

Dans cette optique, la présente étude vise à explorer les effets des CLA produits par deux souches probiotiques *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. animalis* Bb12 sur les hépatocytes et les adipocytes des rats Wistar nourris avec un régime hyper-gras.

IV.4. Matériels et Méthodes

IV.4.1. Matériels

Les souches bactériennes (se référer au chapitre II paragraphe II.4.1. page 44 de ce manuscrit), l'acide linoléique (chapitre II paragraphe II.1.4. page 45), le modèle animal (chapitre III paragraphe III.1.4.3. page 58), les régimes alimentaires (chapitre III.4.2.2. page 59) et les kits de dosage des triglycérides et du cholestérol (III.4.2.8. page 61) utilisés dans cette expérience ont été présentés précédemment au chapitre III.

IV.4.2. Méthodes

IV.4.2.1. Protocole expérimental

Les conditions d'élevage et d'adaptation des rats à l'expérience sont les mêmes que celles décrites au chapitre III (se référer au III.4.2.1. page 58).

Les rats ont été répartis en 4 lots ; 3 lots soumis au régime HFD, dont deux recevaient une concentration de 1×10^9 UFC/mL de souches LBRE-LSAS ou Bb12 séparément additionnée de 1.4% d'acide linoléique par administration orale pendant 8 semaines, et un témoin qui recevaient une solution de PBS stérile. Tandis que les rats du 4^{ème} lot recevaient un régime standard (SD).

IV.4.2.2. Sacrifice des animaux et prélèvement d'organes

Après 8 semaines d'expérimentation, les rats ont été anesthésiés par du chloroforme puis sacrifiés après 12h de jeune. Des parties de foie et de tissu adipeux des rats ont été récupérées, rincées à l'eau physiologique, puis conservés dans une solution de formol tamponnée à 10% (V/V). Les parties de foie et de tissu adipeux restantes ont été utilisées pour la détermination des paramètres biochimiques.

IV.4.2.3. Préparation d'homogénats d'organes

10 mL d'eau physiologique ont été additionnés à 1g d'organe. Après broyage à l'ultraturax et centrifugation à 3000 t/min pendant 10 min, le surnageant a été récupéré dans un tube sec.

Un volume de SDS (Sodium dodecyl sulfate) à 1% (P/V) a été additionné à un volume du surnageant récupéré. L'homogénat a été gardé 1h dans de la glace puis conservé à -20C°.

IV.4.2.4. Dosage du cholestérol total et des triglycérides

Le dosage du cholestérol total et des triglycérides est réalisé par méthode colorimétrique enzymatique (Kit Spinreact, Sant Esteve De Bas, Spain pour le cholestérol et Kit Biolabo, Maizy, France pour les triglycérides), sur l'homogénat d'organes. Le principe de ce dosage est décrit au chapitre III paragraphe III.4.2.8. page 61 de ce manuscrit).

IV.4.2.5. Analyse histopathologique

Le foie et le tissu adipeux ont été fixés dans une solution de formol tamponnée 10%, déshydratés dans des séries d'alcool-xylène, puis inclus en paraffines. Les coupes fines obtenues avec un microtome ont été colorées à l'éosine -hématoxyline (H&E) selon le protocole de Kiernan (1990), puis l'observation microscopique a été faite par un analyseur d'images (Optika-Italie).

Préparation des coupes histologiques

Les coupes histologiques s'effectuent en trois étapes principales:

- **Fixation**

La fixation consiste à protéger les tissus prélevés de toute hydrolyse due à la libération des enzymes contenues dans les lysosomes cellulaires. Les fixateurs les plus utilisés sont le liquide de Bouin et le formol à 10% ; cette étape dure 5 à 15 jours, elle dépend de l'épaisseur du prélèvement.

- **Inclusion**

L'inclusion permet d'imprégner les tissus par un matériel inerte qui durcit pour obtenir des blocs homogènes renfermant des organes ou des fragments d'organes.

- **Déshydratation**

La déshydratation consiste à éliminer l'excès de fixateur par un lavage rapide à l'eau du robinet et ensuite à faire passer les échantillons de tissus dans une série de bains d'alcool à gradient croissant (70°C – 95°C -100°C) jusqu'à élimination de l'eau.

- **Clarification**

La clarification consiste à éliminer l'alcool et le remplacer par une substance miscible avec la paraffine pour rendre les organes plus transparents. Pour ce faire, l'échantillon de tissu est immergé une première fois dans un mélange à parts égales de chloroforme et d'éthanol, puis une deuxième fois dans du chloroforme pur. L'imprégnation et l'enrobage.

La paraffine, dont le point de fusion se situe entre 54 et 56°C, est utilisée à chaud pour imprégner l'échantillon de tissu qui se retrouve enrobé après refroidissement.

Préparation de la coupe

Une fois le bloc de tissu paraffine congelé, des coupes microscopiques de 5 µm réalisées grâce à un microtome pour être placées sur des lames.

Coloration des lames à l'hématoxyline et l'éosine

Le fait de colorer les coupes permet de mettre en évidence les structures tissulaires et cellulaires. La coloration standard la plus utilisée est la coloration Hématoxyline –Eosine (H.E). Le but de la coloration bio-chromique est d'associer un colorant nucléaire et un colorant cytoplasmique.

IV.4.2.6. Analyse statistique des résultats

Ces résultats ont fait l'objet du même traitement statistique que celui indiqué au chapitre II (se référer au chapitre II paragraphe II.4.4. page 48 de ce manuscrit).

IV.5. Résultats et discussion

IV.5.1. Contenu en lipides du foie (cholestérol total et triglycérides)

Les résultats relatifs au contenu en cholestérol total (CT) et en triglycérides (TG) du foie sont présentés au tableau 18. Les teneurs hépatiques en CT et en TG des rats témoins (régime SD) sont restées inchangées et comprises dans l'intervalle des valeurs normales. En revanche, celles mesurées chez les rats nourris au régime HFD dont les valeurs de CT et TG ont significativement augmenté ($p < 0.05$). Cette augmentation était de l'ordre de 54% pour le CT et de 12.8% pour les TG par rapport aux valeurs observées pour le régime standard.

Le traitement des rats à obésité nutri-induite (HFD) par *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS ou par *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 en présence d'acide linoléique réduit

Tableau 18: taux de Triglycérides (TG)* et de cholestérol Total (CT)* hépatiques (mM/g)

Lots	TG	CT
Lot 1: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS -LA	1.28±0.01 ^f	1.13±0.01 ^c
Lot 2: <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> Bb12 LA	1.31±0.01 ^d	1.18±0.01 ^b
Lot 3 : Témoin HFD	1.57±0.01 ^a	1.34±0.01 ^a
Lot 4: Témoin SD	1.48±0.01 ^b	0.87±0.01 ^e

* Chaque valeur représente la moyenne de trois essais ± écart type

a, b: groupes homogènes selon le test de Newman-Keuls avec risque d'erreur $p < 0,05$.

significativement ($p < 0,05$) ces teneurs hépatiques élevées en CT et TG induites par le régime hyper-gras.

Cette réduction était de l'ordre de 11.9 et 15.6% pour le CT chez les rats des lots Bb12 LA et LBRE-LSAS-LA, respectivement ; alors qu'elle était plus élevée pour les TG, soit 16.5 et 18.5% chez les rats des lots Bb12-LA et LBRE-LSAS-LA, respectivement.

Ces résultats sont en accord avec ceux des travaux de Lee et al. (2006) qui ont observé que la souche productrice de CLA, *L. rhamnosus* PL60, réduisait le taux de cholestérol total et de triglycérides au niveau du foie.

Les observations faites dans le présent travail révèlent que les CLA produits par les deux souches probiotiques ont réduit le taux de CT et de TG hépatique. Ceci est en conformité avec ce qui est rapporté à ce sujet dans la littérature.

Bien que certaines études déclarent l'inefficacité des CLA sur la réduction du cholestérol hépatique des souris normales (Ferramosca et al., 2006), Kim et al. (2010) démontrent que les CLA à leurs deux formes, estérifiés et libres, ont la capacité de réduire le cholestérol et les triglycérides hépatiques des souris obèses.

En outre, Purushotham et al. (2007) ont révélé que les CLA alimentaires réduisent l'accumulation des lipides chez les rats Wistar.

L'étude plus récente de Malinska et al. (2015) a démontré que les CLA réduisent l'accumulation des graisses ectopiques au niveau du foie, du myocarde, du muscle squelettique et de l'aorte.

IV.5.2. Effet des CLA produits sur le tissu hépatique

Les coupes histologiques traduisant l'effet des CLA produits par *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 en présence d'acide linoléique sur le foie sont illustrées par la figure 11.

La coloration à l'hématoxyline et l'éosine (H&E) des dépôts lipidiques au niveau du foie a été réalisée pour mettre en évidence l'effet des CLA produits par les souches bactériennes testées sur la stéatose hépatique. La figure 11 montre que les foies des rats nourris avec un régime hyper-gras (HFD) sont caractérisés par une accumulation lipidique et une dégénérescence des graisses (boursoufflures) au niveau des hépatocytes (fig. 11A) par rapport à ceux des rats ayant reçu un régime standard (fig. 11B)

L'administration aux rats de souches bactériennes (*Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS ou *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12) et d'acide linoléique a considérablement diminué le niveau de stéatose hépatique induite par le régime HFD (fig. 11 C et D).

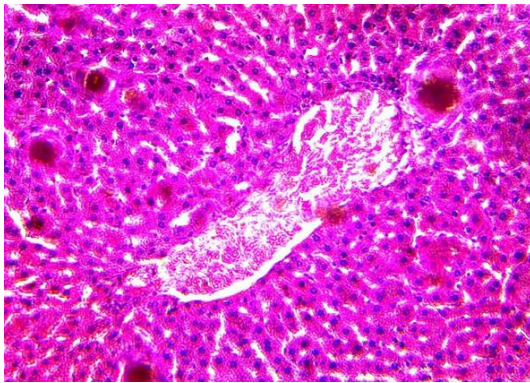
Il est connu que sous un régime hyper-gras, l'excès de l'accumulation de graisses perturbe le métabolisme lipidique au niveau du foie et induit une stéatose hépatique (Wang et al., 2013). Malgré la progression des connaissances accumulées sur la stéatose hépatique au cours de ces dernières années, les mécanismes exacts de son développement et son induction par une alimentation riche en matières grasses ne sont pas encore entièrement élucidés (Song et al., 2016).

Bien que de nombreuses études aient été menées pour démontrer que les CLA réduisent la masse grasse corporelle chez les différentes espèces et modulent également le métabolisme hépatique (Vyas et al., 2012), les mécanismes d'action des CLA pour réduire la graisse corporelle demeurent encore confus : ceci représente une question cruciale puisqu'ils sont aujourd'hui proposés comme suppléments diététiques chez l'humain (Rossi et al., 2012).

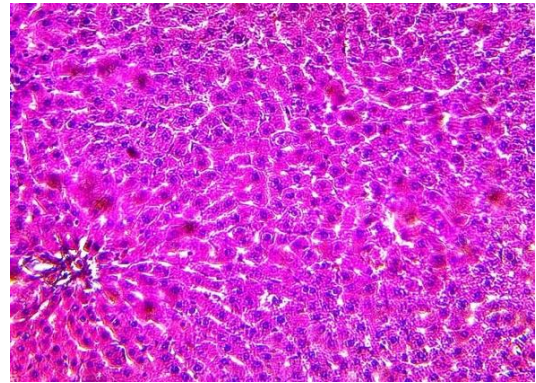
Jusqu'à présent, les gouttelettes lipidiques sont considérées comme un réservoir de stockage inerte de triglycérides (Zechner et al., 2009). De plus, les CLA diététiques sont connus pour leur capacité à réduire l'accumulation de lipides dans les hépatocytes, contribuant ainsi à la lipolyse (Stringer et al., 2010).

Les résultats obtenus dans la présente étude sont en accord avec les travaux de Kostogryns et Pisulewski (2010) qui ont montré que les CLA modèrent la stéatose hépatique chez les rats. Par ailleurs, Lee et al. (2006) ont mis en évidence l'effet des CLA produits par une souche bactérienne d'origine humaine dans la prévention de la stéatose hépatique chez les souris obèses.

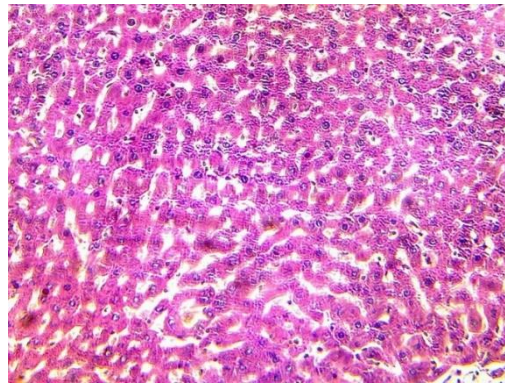
(A)



(C)



(B)



(D)

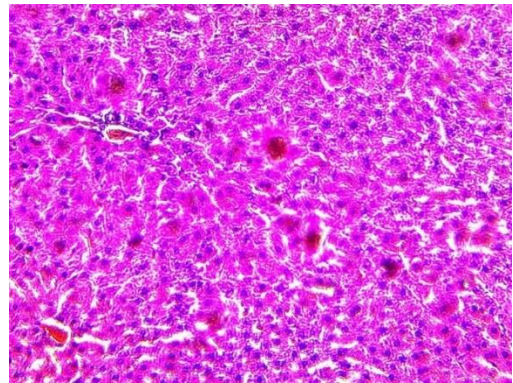


Figure 11 : Observation microscopique des coupes (5 μ m) histologiques (x100) du foie de rats mâles nourris avec un régime standard (A) ou un régime hyper-gras ou HFD (B) sans souches bactériennes ni acide linoléique ; ou encore avec un régime hyper-gras(HFD) avec *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS+ acide linoléique (C) ou *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12+ acide linoléique (D).

IV.5.3. Teneurs en cholestérol total et en triglycérides du tissu adipeux

Les teneurs en cholestérol total (CT) et en triglycérides (TG) du tissu adipeux sont présentés au tableau 19. Il apparaît clairement que chez les rats ayant reçu le régime hyper-gras, il y a eu, respectivement, 17.5 et 35% d'augmentation des teneurs en CT et en TG du tissu adipeux par rapport aux rats témoins ayant été nourris avec le régime standard.

Chez ces mêmes rats (nourris au régime hyper-gras ou HFD), l'administration de *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS ou *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12) et d'acide linoléique induit une réduction significative ($p < 0.05$) de ces teneurs en CT et en TG du tissu adipeux.

Les taux de réduction en CT du tissu adipeux enregistrés s'élèvent à 39.6 et de 42.9% pour les rats HFD supplémentés avec l'acide linoléique et traitées par les souches Bb12-LA et LBRE-LSAS-LA, respectivement. Dans le même sillage et chez les mêmes animaux, ceux en TG sont sensiblement plus élevés et représentent 46.4 et 48.1% les lots recevant les souches Bb12-LA et LBRE-LSAS-LA, respectivement.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux publiés par Lee et al. (2006) qui attribuent l'amélioration du profil lipidique du tissu adipeux de souris obèses au CLA produit par une souche du genre *lactobacillus* d'origine humaine.

En outre, une autre étude publiée par Hu et al. (2012) est venue renforcer les observations de Lee et al. (2006) en mettant en lumière cet effet répressif des CLA sur les teneurs en cholestérol total et en triglycérides du tissu adipeux des rats obèses.

IV.5.4. Etude histopathologique du tissu adipeux

Les coupes histologiques qui illustrent l'effet des CLA produits par *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS ou *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 sur le tissu adipeux des rats nourris avec un régime hyper-gras supplémenté avec de l'acide linoléique sont présentées dans la figure 12.

A l'échelle cellulaire, l'obésité est due à l'augmentation de la taille ou du nombre des adipocytes différenciés à partir des fibroblastes dans le tissu adipeux (Hu et al., 2012).

La comparaison des coupes du tissu adipeux de rats nourris au régime standard (fig.12A) et de rats recevant un régime hyper-gras ou HFD (fig.12B) démontre cet effet régime sur l'augmentation de la taille des adipocytes par suite de l'accumulation de lipides.

Table 19: Teneurs en triglycérides (TG)* et en cholestérol total (TC)* du tissu adipeux (mM/g)

Lots	TG	CT
Group 1: HFD+ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LBRE-LSAS+AL	1.79±0.01 ^g	0.69±0.01 ^e
Group 2: HFD+ <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp <i>lactis</i> +AL	1.85±0.01 ^f	0.73±0.01 ^d
Group 3 : Témoin HFD	3.45±0.01 ^a	1.21±0.01 ^a
Group 4: Témoin Standard	2.55±0.01 ^b	2.55±0.01 ^b

* Chaque valeur * représente la moyenne de trois essais ± écart type

a, b : Groupes homogènes selon le test de Newman-Keuls avec risque d'erreur $p < 0,05$.

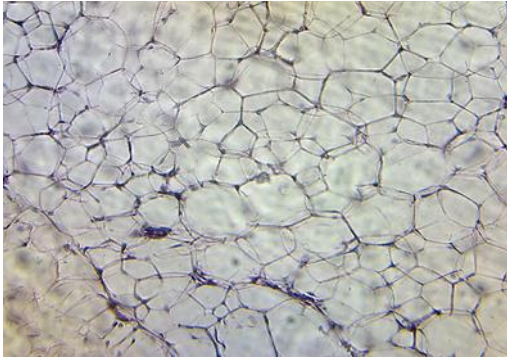
La taille de ces adipocytes a nettement régressé lorsque les rats HFD ont reçu de l'acide linoléique et l'une des souches testées, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (fig.12C) ou *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 (fig.12D).

Ces observations sont similaires à celles décrites dans l'étude de DeClercq et al. (2010) qui rapporte une réduction de la taille des adipocytes chez des rats recevant l'isomère t10 c12 CLA.

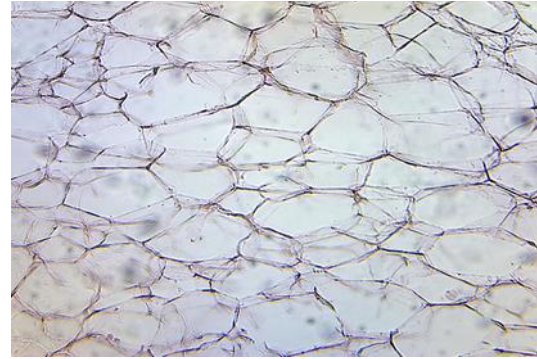
C'est pourquoi, les CLA alimentaires attirent de plus en plus l'attention des nutritionnistes et des diététiciens comme moyens potentiels de lutte contre le syndrome métabolique en général et contre l'obésité en particulier (Onakpoya et al., 2012).

Certaines études (Whigham et al., 2007) avaient noté l'existence d'une synergie entre différents isomères conjugués de l'acide linoléique dans leur action modulatrice de l'adipogénèse. Ainsi, le mélange des isomères c9-t11 CLA et t10-c12 CLA demeure le plus actif biologiquement ; alors que l'isomère t10-c12 CLA seul, induit une réduction de l'adiposité et de l'accumulation lipidique

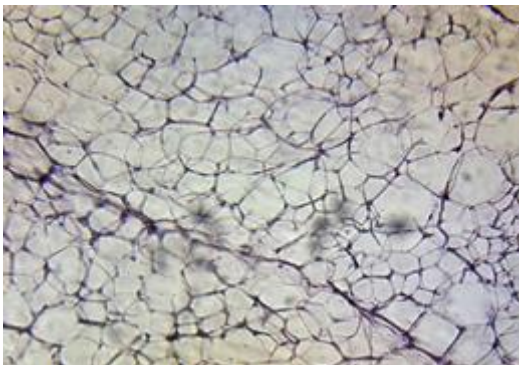
(A)



(B)



(C)



(D)

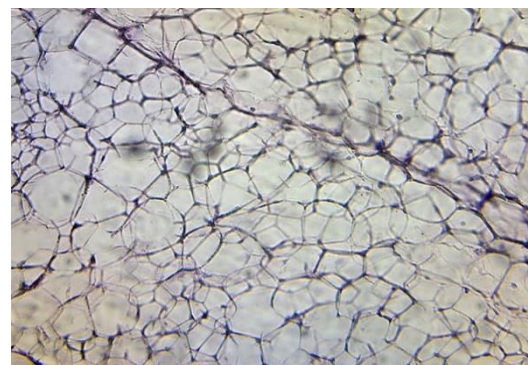


Figure 12 : Observation microscopique des coupes (5 μ m) histologiques (x100) du tissu adipeux de rats mâles nourris avec un régime standard (A) ou un régime hyper-gras ou HFD (B) sans souches bactériennes ni acide linoléique ; ou encore avec un régime hyper-gras(HFD) avec *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS+ acide linoléique (C) ou *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12+ acide linoléique (D).

IV.6. Conclusion

Cette étude a été menée dans le but d'explorer l'effet des isomères de CLA produits *in vivo* par deux souches probiotiques, *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. animalis* subsp. *lactis* B12 sur les hépatocytes et les adipocytes des rats Wistar soumis à un régime hyper-gras.

D'abord, leurs effets sur les profils lipidiques du foie et du tissu adipeux ont été testés. Effectivement, nous avons constaté que les isomères de CLA produits par les deux souches ont fait baisser les taux de cholestérol total et de triglycérides au niveau des deux tissus étudiés.

En outre, l'étude histopathologique a montré que les CLA bactériens ont exercé un effet préventif contre la stéatose hépatique induite par le régime hyper-gras. Par ailleurs, l'analyse histologique du tissu adipeux a révélé que les isomères de CLA issus de la conversion de l'acide linoléique par les souches testées, ont réduit la taille des adipocytes des rats traités.

L'ensemble de ces observations laisse présager un rôle anti-obésité des isomères de CLA bactériens.

-

Chapitre V :
Effets des Isomères
Bactériens de l'Acide
Linoléique Conjugué (CLA)
sur le Stress Oxydatif et
l'Inflammation chez des rats
Wistar à obésité Nutri-
Induite par un Régime
Hyper-Gras.

CHAPITRE V : Effets des Isomères bactériens de l'Acide Linoléique conjugué (CLA) sur le stress oxydatif et l'inflammation chez des rats Wistar à obésité Nutri-Induite par un Régime Hyper-Gras.

V.1. Résumé

Ce chapitre présente le protocole et les résultats de l'exploration des effets antioxydants et anti-inflammatoires des isomères bactériens de l'acide linoléique conjugué produits in Vivo par deux souches probiotiques *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* B12. Cette expérience a utilisé les mêmes lots de rats et les mêmes régimes alimentaires que ceux du protocole décrit au chapitre IV de cette thèse. Les taux de malonaldéhyde (MDA), de superoxyde dismutase (SOD), de catalase (CAT) et des prostaglandines PGE₂ ont été déterminés dans le sérum. Les résultats obtenus montrent que les rats des lots traités n'affichent pas d'augmentation du taux de peroxydation lipidique (MDA) ; alors que l'activité des enzymes antioxydantes a été significativement ($p < 0.05$) boostée chez les rats traités, spécialement chez le lot soumis au régime HFD et traité par la souche LBRE-LSAS. Par ailleurs, le taux des prostaglandines E₂ a été significativement ($p < 0.05$) réduit chez les animaux traités. Ces résultats montrent que les souches productrices de CLA, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12, réduisent le stress oxydatif et préviennent l'inflammation induite par l'obésité chez les rats.

Mots clés: Stress oxydatif- Inflammation - Régime hyper-gras ou HFD- Probiotiques- Acide linoléique conjugué ou CLA

V.2. Abstract

This chapter introduces the experimental procedure and results on the effect of bacterial isomers of conjugated linoleic acid (CLA) produced in Vivo by two probiotic strains, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12, on some oxydative stress parameters and inflammation. The present experiment was conducted with the same rat groups and the same diets as previously described in chapter IV of this manuscript. Serum levels of malonaldehyde (MDA), superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT) and prostaglandins (PGE₂) were monitored. Obtained results showed that treated groups did not exhibit an increase in lipid peroxydation like those of untreated high-fat diet fed rats (control group) did. Besides, activity of antioxydant enzymes SOD and CAT was markedly ($p < 0.05$) increased in treated rat groups; whereas prostagnadins E₂ level was reduced in treated rats, especially in LBRE-LSAS strain given high-fat diet rats. Such results strongly support the occurrence of the bacterial power of *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 to improve oxydative stress and to prevent obesity-induced inflammation in high-fat diet fed rats.

Key- words : Oxydative stress- Inflammation- High-Fat Diet- Probiotic bacteria- Conjugated Linoleic Acid.

V.3. Introduction

Le lien entre santé et alimentation est plus que jamais d'actualité. En effet, les recherches récentes confirment le rôle déterminant de l'alimentation dans la prévention des maladies telle que l'obésité qui représente un sérieux problème de santé publique, associée à des anomalies métaboliques, résultat d'une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) susceptibles d'attaquer les cibles cellulaires, favorisant des dommages oxydatifs au niveau des lipides, des protéines, des acides nucléiques, et pouvant notamment conduire à un dysfonctionnement endothélial et à des processus inflammatoires (Mellouk et al., 2016).

Le stress oxydatif est un terme général qui représente les dommages cellulaires provoqués par un déséquilibre entre les pro-oxydants tels que les (substances oxygénées réactives ou ROS et / ou les espèces azotées réactives (RNS). Des agents ROS sont générés au cours du métabolisme cellulaire oxydant lorsque la réduction chimique d'oxygène forme des radicaux libres instables, caractérisés par un électron non apparié (Huang et al., 2015).

En outre, l'inflammation induite par l'obésité est souvent associée à une augmentation du stress oxydatif. La leptine, une hormone adipocytaire, est élevée chez les personnes obèses et peut induire un stress oxydatif et joue un rôle clé dans la médiation d'un état pro-inflammatoire de l'obésité (Rousselot, 2013). Ahmed et Beg, (2016) ont indiqué que ce lien physiologique peut aider à expliquer la relation entre l'obésité, le stress oxydatif et l'inflammation.

En outre, l'ingestion chronique de repas riches en lipides peut également favoriser le stress oxydatif, conduire à un gain de poids et, en conséquence, faciliter le développement de l'insulinorésistance périphérique. Ces effets néfastes pour la santé peuvent être atténués par des stratégies spécifiques d'apport en nutriments, y compris la restriction calorique (RC) et la consommation d'antioxydants exogènes.

L'acide linoléique conjugué (CLA) a attiré l'attention pour ses effets bénéfiques sur la santé, son pouvoir modulateur des -dyslipidémies, de l'obésité, l'inflammation, des cancers et du diabète (Yang et al., 2015).

L'objectif de la présente étude consiste à explorer l'effet du CLA issu de la conversion *in vivo* de l'acide linoléique par deux souches probiotiques, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12, sur quelques paramètres du stress oxydatif et sur l'inflammation chez des rats Wistar nourris avec un régime hyper-gras .

V.4. Matériels et méthodes

V.4.1. Matériel biologique, réactifs, mise en lots des rats et prélèvements

- Les souches bactériennes (II.4.1. page 44), l'acide linoléique (II.4.1. page 45), le modèle animal (III.1.4.3. page 58), le Tween 80 (II.4.1. page 45) et les régimes alimentaires (III.4.2.2. page 59) ont été présentés précédemment (se référer aux chapitres indiqués entre parenthèses).

- Les rats utilisés dans cette expérience sont ceux décrits au chapitre IV de ce manuscrit (se référer au paragraphe IV.4.2.1. page 74). Leur sacrifice a été effectué dans les mêmes conditions que celles indiquées dans les expériences précédentes. Le prélèvement de sang a été effectué par ponction dans l'aorte abdominale. Une quantité du sang prélevé est récupérée dans des tubes à EDTA et l'autre partie est recueillie dans des tubes secs. Les échantillons prélevés sur tubes EDTA sont centrifugés à 3000 tr/min pendant 15 min. Le plasma est prélevé pour le dosage des paramètres du stress oxydatif. Les péritoines ont été récupérés, rincés à l'eau physiologique, puis conservés pour la détermination des prostaglandines PGE₂.

V.4.2. Méthodes de dosages.

V.4.2.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est le marqueur le plus utilisé en peroxydation lipidique. Ce dosage a été réalisé selon la méthode de Draper et Haldey (1990) qui consiste en un traitement acide à chaud de l'échantillon et à l'utilisation de l'acide thiobarbiturique (TBA). Le plasma a été incubé 20 min à 100°C avec le TBA et l'acide trichloroacétique (TCA). Après incubation, refroidissement et centrifugation de l'échantillon à 4000t/min pendant 10 min, la lecture a été réalisée sur le surnageant qui contient le MDA. Le TBA réagit avec les aldéhydes pour former un produit de condensation chromogénique consistant en 2 molécules de TBA et une molécule de MDA dont l'absorption se fait à 532 nm. La concentration en MDA plasmatique a été calculée en utilisant une droite étalon de MDA ou le coefficient d'extinction du complexe MDA-TBA ($E=1,56 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ à 532 nm).

V.4.2.2. Dosage de l'activité superoxyde dismutase (SOD)

L'enzyme superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l'anion superoxyde (O₂⁻) en peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène moléculaire, elle représente l'une des plus

importantes enzymes antioxydantes. Son dosage a été réalisé par la méthode indirecte utilisant le nitrobleu tétrazolium (NBT).

V.4.2.3. Détermination de l'activité de la catalase (CAT)

Cette activité enzymatique a été mesurée par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène (Aebi, 1974). En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H₂O₂ en fonction du temps. Le milieu réactionnel contient le lysat érythrocytaire dilué au 1/500, le H₂O₂ et le tampon phosphate (50 mM/l, pH 7,0). Après incubation, le réactif de coloration, l'oxyde de sulfate de titanium (TiOSO₄) (préparé dans H₂SO₄ 2N) est ajouté. La lecture se fait à 420 nm. Les concentrations en H₂O₂ restantes ont été déterminées à partir d'une gamme étalon de H₂O₂ avec le tampon phosphate et le réactif TiOSO₄ de façon à obtenir dans le milieu réactionnel des concentrations de 0,5 à 2 mM /l.

Le calcul d'une unité d'activité enzymatique est : $A = \log A_1 - \log A_2$.

A₁ est la concentration de H₂O₂ de départ

A₂ est la concentration de H₂O₂ après incubation

L'activité spécifique est exprimée en U/g Hb ou en U/ml.

V.4.2.4. Dosage des prostaglandines PGE₂

La concentration en prostaglandines E₂ a été mesurée par méthode Elisa (Kit Elisa Cusabio, US). Sur la plaque de titration pré-revêtue des anticorps spécifiques de PGE₂, les échantillons et le standard aux microtitrages appropriés ont été ajoutés dans les puits avec des anticorps polyclonaux conjugués à la biotine spécifique de PGE₂. Ensuite, l'avidine conjuguée à la peroxydase de raifort (HRP) a été ajoutée à chaque puits et la microplaque a été incubée. Puis un TMB **donnez le volume ajouté** (3,3', 5, 5' tétraméthylbenzidine) a été ajoutée à chaque puits. Seuls les puits qui contiennent la PGE₂, l'anticorps conjugué à la biotine et l'avidine conjuguée à l'enzyme présenteront un changement de coloration. La réaction enzyme-substrat a été terminée par l'addition d'acide sulfurique et le changement de couleur a été mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm. La concentration en PGE₂ dans les échantillons a été ensuite déterminée en comparant les densités optiques des échantillons à celles de la courbe standard.

V.4.2.5. Dosage des protéines sériques totales

Les protéines sériques totales ont été dosées par la méthode colorimétrique de Lowry et al. (1951) qui repose sur la réaction de Biuret (Kit Spinreact, Santa Coloma, Espagne). Les protéines donnent un complexe bleu violet intensif avec des sels de cuivre dans un milieu alcalin. L'iodide est ajoutée comme un antioxydant. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de protéine totale dans l'échantillon. L'absorption est mesurée à 540 nm.

V.4.2.6. Dosage de l'albumine sérique

L'albumine **sérique** a été dosée par la méthode colorimétrique (Kit Spinreact, , Santa Coloma, Espagne). L'albumine en présence de bromocrésol vert à un pH légèrement acide, produit un changement de couleur de l'indicateur du jaune vert au vert-bleue. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration de l'albumine dans l'échantillon. L'absorption est mesurée à 630 nm.

V.4.2.7. Analyse statistique des résultats

Ces résultats ont fait l'objet du même traitement statistique que celui indiqué au chapitre II (se référer au chapitre II paragraphe II.4.5. page 47 de ce manuscrit).

V.5. Résultats et discussion

V.5.1. Effet des isomères de CLA sur la peroxydation lipidique : taux de MDA

Les résultats relatifs aux concentrations de malonaldéhyde plasmatique sont illustrés par la figure 13. Les valeurs obtenues montrent que le niveau de MDA est significativement plus élevé ($p < 0.05$) chez les rats obèses consommant un régime hyper-gras (RHG) par rapport à celui des rats soumis au même régime, mais traités avec les souches bactériennes et l'acide linoléique. Cet effet « souches + acide linoléique » s'exprime par la réduction de la concentration de MDA, même par rapport au lot recevant un régime standard. Cet effet a été plus prononcé avec la souche LBRE-LSAS par rapport à la souche Bb12.

La peroxydation lipidique est un processus basique de détérioration cellulaire induit par le stress oxydatif et qui se produit facilement dans les tissus riches en acides gras polyinsaturés oxydables, qui peut conduire à la mort cellulaire. Pendant ce processus de peroxydation lipidique, l'hydroperoxyde est généré en tant que produit primaire dans les réactions radicalaires.

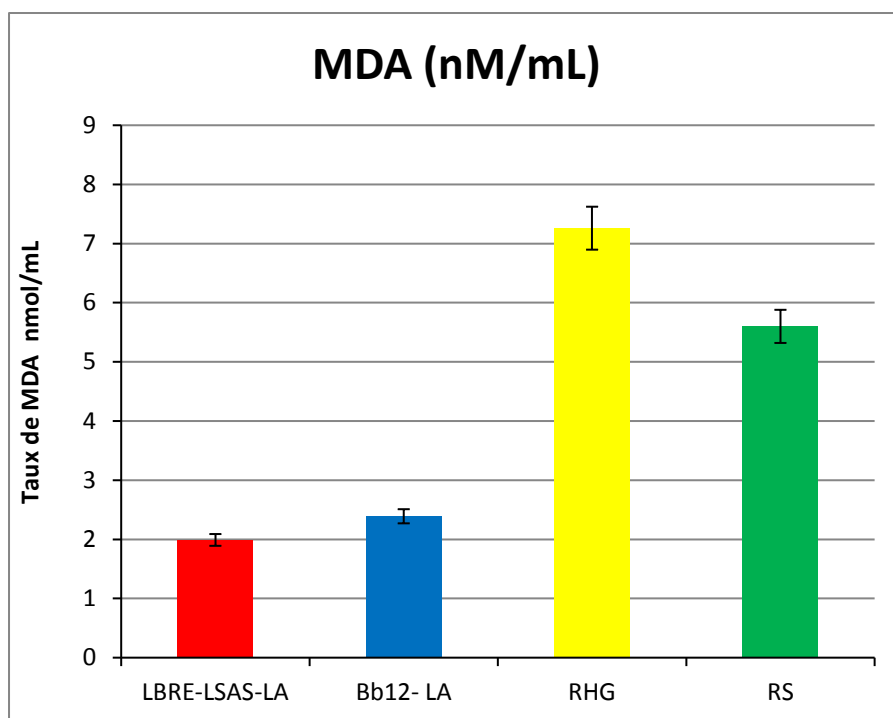


Figure 13 : Teneurs plasmatiques en malonaldéhyde (MDA) (nM/mL) chez les des rats Wistar mâles recevant un Régime Hyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS). Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm écart type (n = 3)

Les substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances) sont les produits secondaires, et qui sont exprimés en MDA, un indicateur du stress oxydatif cellulaire (Yamasaki et al., 2000).

En ce qui concerne les effets des isomères de CLA sur la peroxydation lipidique, nous avons constaté une réduction significative ($p < 0.05$) de l'indice de peroxyde lipidique; ce qui suggère que le CLA produit par nos souches bactériennes aurait une propriété antioxydante comme cela fut rapporté pour d'autres bactéries par plusieurs études sur le sujet (Kim et al., 2005 ; Moon et al., 2009; Santos-Zago et al., 2007 ; Park et al., 2010 ; Marineli et al., 2012 ; Eftekhari et al., 2013).

Cependant, il faut signaler que nos résultats contrarient ceux de Basu et al. (2000) et de Santos-Zago et al., 2007 qui, eux, préconisent que les isomères de CLA ont un effet, plutôt, pro-oxydant.

Ces résultats contradictoires en relation avec les indicateurs de peroxydation lipidique révèlent que la supplémentation en CLA influence le processus de peroxydation lipidique de différentes manières. Cette influence dépend de l'auto-oxydation de l'indicateur utilisé, son tissu et de la méthode de sa détermination (Marineli et al., 2012). Cependant, le mécanisme qui peut illustrer ces interprétations n'est pas encore élucidé.

Néanmoins, il convient de souligner la controverse qui existe encore à travers la littérature à propos des effets du CLA sur le stress oxydatif. Il n'y a pas encore de consensus sur l'effet réel des isomères du CLA sur le processus d'oxydation des lipides biologiques, car de nombreuses études leurs attribuent des propriétés antioxydantes ; alors que d'autres, au contraire, les considèrent comme pro-oxydants.

V.5.2. Activité des enzymes antioxydantes : SOD et CAT

Les résultats relatifs à l'activité des enzymes antioxydantes sont reportés dans les figures 14 (superoxyde dismutase ou SOD) et 15 (catalase ou CAT).

La CAT et la SOD sont les deux plus importantes enzymes de balayage des radicaux et de défense secondaire de l'organisme contre les métabolites de l'oxygène dont la production est due à la transition des métaux lourds (Ahmed et Beg, 2016).

Nos résultats montrent que les rats des lots traités par les souches probiotiques et l'acide linoléique affichent des taux d'activité SOD et CAT significativement ($p < 0.05$) plus élevés que ceux enregistrés chez les témoins. Cette augmentation d'activité de la SOD était de l'ordre de 87.8 et 79.10% pour les isomères de CLA produits par les souches LBRE-LSAS et Bb12, respectivement. Concernant l'activité de la CAT, l'augmentation était de l'ordre de 75.7 et 53.7% pour les isomères de CLA produits par les souches LBRE-LSAS et Bb12, respectivement.

Il est connu que les isomères de CLA agissent comme un ligand du récepteur activé par les proliférateurs de peroxydation PPAR α (Marineli et al., 2013) et l'augmentation de l'expression de PPAR α causerait une augmentation de l'oxydation des acides gras au niveau des mitochondries et des peroxydation. Ceci a pour conséquence une élévation de la production de peroxyde d'hydrogène ; ce qui induirait l'augmentation de l'activité de la CAT comme réponse à la production de CLA.

Les résultats obtenus dans la présente expérimentation vont dans le même sens que ceux publiés par Chinnadurai et al. (2013) qui ont montré que les CLA alimentaires présents

dans le beurre clarifié d'une période de 21 à 51 jours provoquaient chez des rats Wistar une augmentation de l'ordre de 33 et de 20% des activités de la SOD et la CAT, respectivement.

Les taux plus élevés d'augmentation de l'activité de la SOD (87.8%) et de la CAT (79.1%) obtenus dans notre étude pourraient être dus à la nature des isomères de CLA et à la présence des souches probiotiques à la fois.

Cette propriété des isomères de CLA à augmenter l'activité de ces enzymes antioxydantes a, également, été observé chez le poulet par Ko et al. (2004). En effet, des résultats similaires ont été obtenus par Santos Zago et al. (2007) qui ont montré que l'administration de CLA à des rats augmentait les niveaux plasmatiques de catalase et de peroxydase; ce qui a conduit à une amélioration du processus antioxydant.

Une autre étude de Varady et al. (2011) a rapporté que la graisse oxydée augmente la concentration nucléaire de NF-kB et Nrf2 et la transcription des gènes responsables du stress oxydatif codant pour les aldo-Céto réductase 1B8, vanine-1, glutathion peroxydase 1, et superoxyde dismutase-1. Ainsi, les isomères de CLA joueraient un rôle déterminant dans la prise en charge du stress oxydatif chez les rats et l'élimination des radicaux libres du système biologique.

Par ailleurs, l'effet du CLA alimentaire sur la capacité antioxydante semblait être variable selon le régime alimentaire, la composition du mélange CLA, et même selon la nature des espèces (Stangle, 2000).

Leung et Liu (2000) ont rapporté que l'isomère trans-10, cis- 12-CLA possédait une plus forte capacité de réduction des radicaux libres que l'isomère cis-9, trans-11-CLA.

À la lumière des observations faites par ces auteurs, nos résultats laissent suggérer que les écarts dans l'augmentation de l'activité enzymatique SOD et CAT observés seraient partiellement dûs aux propriétés antioxydantes de l'isomère trans-10, cis-12-CLA et de l'isomère cis-9, trans-11-CLA.

Dans la même optique, Yu et al. (2002) ont également rapporté que les différents isomères CLA montrent individuellement différentes actions sur le balayage des radicaux libres.

Le stress oxydatif induit par la peroxydation des lipides peut affecter les mécanismes de défense antioxydante, représentés par les enzymes antioxydantes comme la GSH-Px, la SOD,

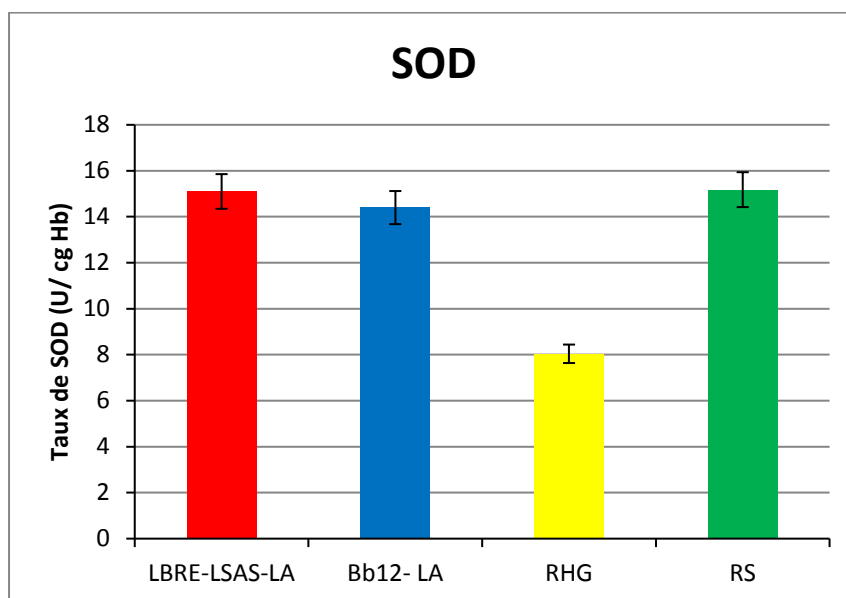


Figure 14 : Taux d'activité de la superoxyde dismutase (SOD) (U/ cg Hb) chez des rats Wistar mâles recevant un Régime Hyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS). Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm écart type (n = 3).

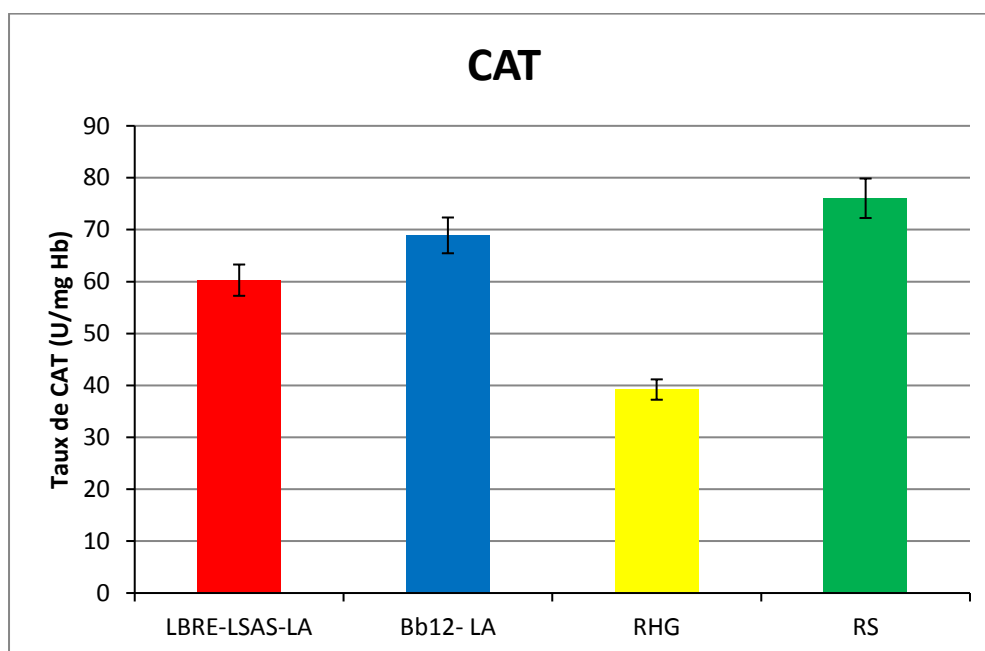


Figure 15 : Taux d'activité de la catalase (CAT) (U/ cg Hb) chez des rats Wistar mâles recevant un Régime Hyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS). Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm écart type (n = 3).

et la CAT (Youdim et Deans, 1999). Les oxydants en excès sont captés par la SOD, la GSH-Px, et la CAT.

Au début, la SOD convertit l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène pendant la réaction antioxydante cellulaire, ensuite la GSH-Px et la CAT détoxifient indépendamment les peroxydes d'hydrogène (Ko et al., 2004).

V.5.3. Effet des isomères bactériens de CLA produits sur les prostaglandines E₂

Les résultats relatifs aux teneurs plasmatiques en prostaglandine E₂ sont illustrés par la figure 16. L'inflammation est déclenchée par la réponse du système immunitaire aux infections et aux blessures ; et les prostaglandines (PG) qui en résultent, y compris les PGE₂, sont des médiateurs clés responsables d'une large gamme d'effets physiologiques et biologiques sur la douleur, le cancer, l'accident vasculaire cérébral, les maladies neuro-dégénératives (Shin et al., 2016).

Bien que les niveaux de PG soient généralement faibles dans des environnements normaux, ils sont augmentés de façon spectaculaire par les réponses inflammatoires aiguës (Korbecki et al., 2013).

Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que les taux de PGE₂ ont été significativement réduits ($p < 0.05$) de 59.12 et de 58.80% chez les lots de rats ayant reçu un régime hyper-gras contenant de l'acide linoléique et traités par les souches LBRE-LSAS et Bb12, respectivement. Ainsi, l'effet « souche+acide linoléique » sur la réduction du niveau de prostaglandines chez le modèle rat à obésité nutri-induite a été amplement exprimé dans cette expérience.

L'augmentation du taux des PGE₂ chez le lot témoin soumis au régime hyper-gras pourrait être expliquée par le déclenchement d'un état inflammatoire induit par l'obésité résultant du régime hyper gras.

En effet, il a été rapporté que l'obésité augmente la circulation des bio-marqueurs pro-inflammatoires tels que la protéine réactive C (CRP), l'interleukine IL-6, et les prostaglandines E₂ (PGE₂) (Crespi et al., 2016). En outre, les stimulateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α augmentent la COX2 (cyclooxygénase- 2), et produisent les PGE₂ (prostaglandines E₂) pro-inflammatoires. La PGE₂ est produite par les macrophages produisant IL-1 et TNF α (Kim et Kim, 2013).

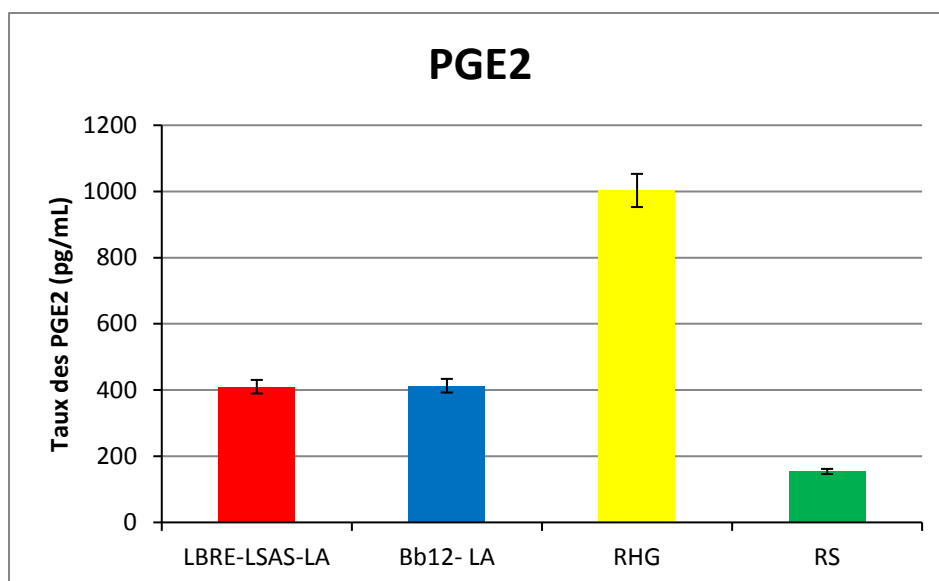


Figure 16: Teneurs en prostaglandines E₂ (PGE₂) (pg/mL) chez des rats Wistar mâles recevant un Régime Hyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS). Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes ± écart type (n = 3).

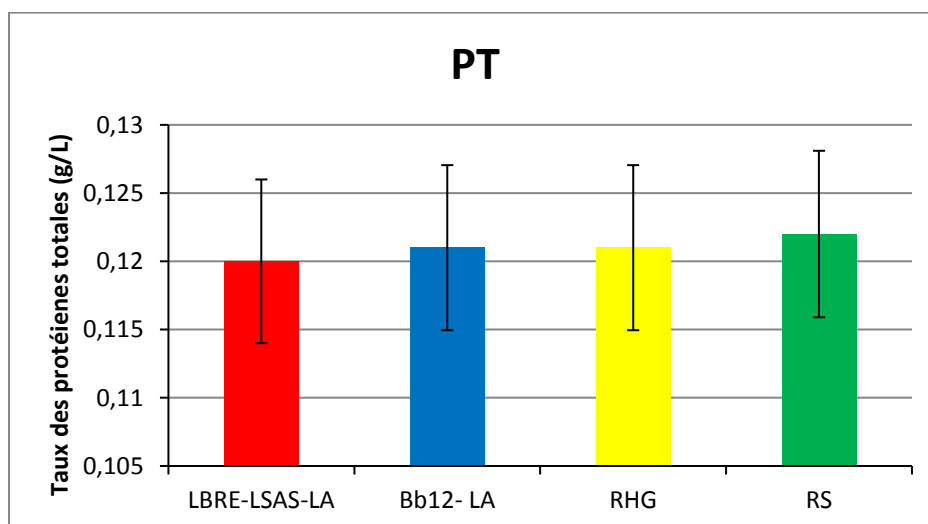


Figure 17 : Teneurs en protéines totales (g/L) chez des rats Wistar mâles recevant un Régime Hyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS). Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes ± écart type (n = 3).

Les effets bénéfiques des CLA alimentaires sur l'immunité et les réponses inflammatoires ont été rapportés chez un certain nombre de modèles animaux (Cook et al., 1993; Bassaganya-Riera et al., 2003; Yu et al., 2002; Yang et Cook, 2003; Dilzer et Park, 2012) et chez les humains (Albers et al., 2003; Turpeinen et al., 2008; Peterson et al., 2009). Ces effets consistent en la réduction de l'inflammation du colon et de la production des cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires, ainsi qu'à la modulation des médiateurs inflammatoires comme les prostaglandines (Viladimiu et al., 2015).

De plus, l'isomère C-9, t-11 CLA est capable de réduire les IgE, l'interleukine IL-12 et l'expression des prostaglandines E₂ (Viladimiu et al., 2015).

Nos résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Nakanishi et al. (2003) qui a montré que les isomères CLA réduisent les PGE₂ chez les souris.

Par ailleurs, une étude de Stachowska et al. (2010) révèle que les isomères de CLA ont la capacité de réguler la synthèse des prostaglandines E₂ par les macrophages humains.

En outre, plusieurs études ont rapporté l'effet anti-inflammatoire des isomères de CLA alimentaires *in Vivo* et sur les cultures cellulaires par l'inhibition de la COX-2, conduisant à une diminution de la libération de la PGE₂ (Flowers & Thompson, 2009; Li et al., 2005; Nakamura et Omaye, 2009; Stachowska et al., 2007).

V.5.4. Effet des isomères de CLA produits sur la protéinémie et l'albuminémie.

Les résultats relatifs aux teneurs plasmatiques en protéines totales et en albumine sont représentés dans les figures 17 et 18. Il n'apparaît pas de changements significatifs au niveau des protéines totales sous l'effet des isomères de CLA. En revanche, l'albuminémie semble diminuée chez les rats ayant reçu les souches bactériennes et l'acide linoléique par rapport au témoin. Ceci indique l'existence d'un effet « souche+acide linoléique » sur l'albuminémie.

Ces observations sont analogues à celles rapportées par l'étude de Babaei et al. (2015) qui montre que le taux d'albumine s'avère plus élevé chez les sujets obèses et qu'il était inversement proportionnel à celui de la leptine

Bien que l'hypoalbuminémie reflète un état nutritionnel médiocre, plusieurs études ont montré que la faible concentration d'albumine est plus probablement causée par l'inflammation que par la malnutrition (Fearon et al., 1998).

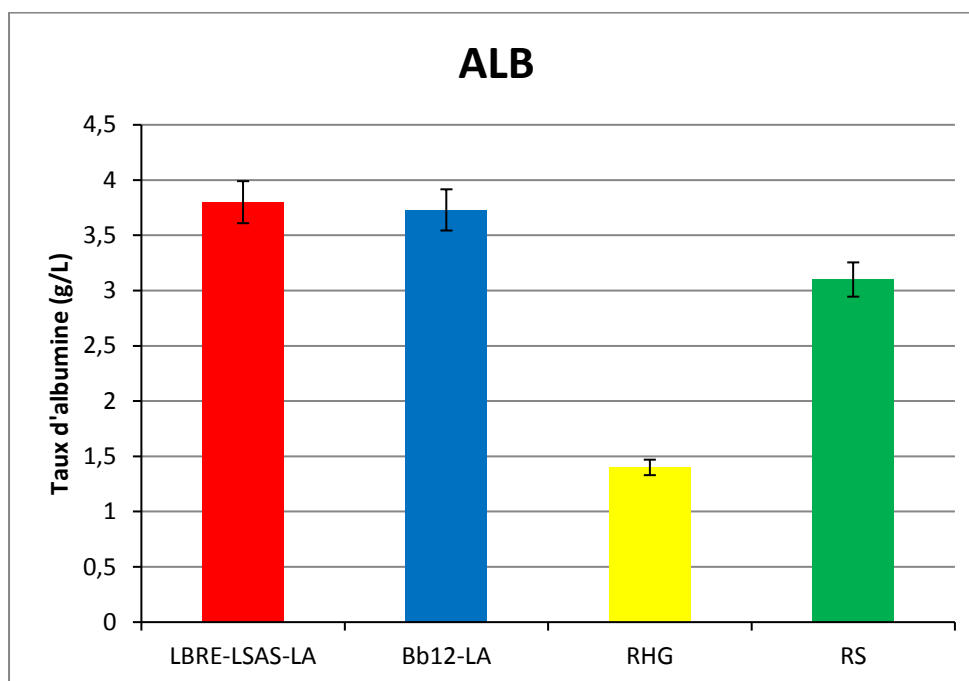


Figure 18 : Teneurs en albumine (g/L) chez des rats Wistar mâles recevant un Régime Hyper-Gras (RHG) ou standard (RS) supplémenté par des bactéries probiotiques et de l'Acide Linoléique (LA) (LBRE-LSAS-LA et Bb12-LA) ou non (RHG et RS).

Les valeurs représentent les moyennes de trois expériences indépendantes \pm écart type (n = 3).

En outre, une faible albuminémie a également été décrite en tant qu'indice indépendant de la survie dans les cancers comme le cancer du sein (Gupta et Lis, 2010).

Nous suggérons que le niveau d'albumine sérique inférieur chez le lot témoin peut être le résultat de la suppression induite par les cytokines inflammatoires.

L'albumine est une molécule de taille moyenne d'un poids moléculaire de 66-69 kDa, et est la protéine la plus abondante dans le plasma humain (40 g/L sur un total de 70g/L).

Synthétisée exclusivement dans le foie, l'albumine joue un rôle important dans un certain nombre de mécanismes physiologiques, comme la régulation de la pression osmotique. C'est aussi le véhicule de nombreuses molécules peu solubles dans l'eau comme les hormones, le cholestérol, le calcium, le fer, la bilirubine, les acides gras libres et les médicaments (Vincent et al., 2014).

Les rôles de l'albumine dans d'autres mécanismes, y compris le glycocalyx endothélial et le maintien de la compétence de la barrière vasculaire, ne sont pas aussi bien compris mais sont susceptibles d'être importants, particulièrement chez les patients présentant une fuite capillaire accrue (Alphonsus et Rodseth, 2014).

L'albumine peut agir comme antioxydant extracellulaire majeur, tampon, agent immunomodulateur, détoxifiant, ou encore comme transporteur plasmatique principal (Artigas et al., 2016).

La synthèse de l'albumine est diminuée en cas de malnutrition et de dysfonction hépatique. En effet, une perméabilité microvasculaire accrue est observée dans les états inflammatoires, ce qui altère la répartition de l'albumine entre les compartiments intra-vasculaires et extra-vasculaire.

Par conséquent, l'albuminémie diminue chez de nombreux patients gravement malades. Un taux d'albumine réduit conduit généralement à la formation d'oedèmes (Artigas et al., 2016).

V.6.Conclusion

Cette étude a été réalisée dans le but d'explorer l'effet des isomères de CLA produits *in vivo* par deux souches probiotiques *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. animalis* subsp. *Lactis* B12 sur quelques paramètres du stress oxydatif et de l'inflammation chez le modèle rat Wistar à obésité nutri-induite par un régime hyper-gras.

Les taux de peroxydation lipidique (MDA) et l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, CAT) ont été déterminés, et les résultats obtenus ont montré que les isomères de CLA produits par les deux souches avaient la capacité de réduire significativement la peroxydation lipidique alors qu'ils étaient capables de booster l'activité des enzymes antioxydantes.

Le dosage des prostaglandines E₂ a révélé que les isomères de CLA pouvaient réduire significativement ces médiateurs pro-inflammatoires dont le taux a été significativement élevé chez les rats obèses non traités.

Quant à l'albumine, les résultats montrent que les animaux des lots traités affichent des taux normaux comparativement aux rats obèses qui affichent une hypoalbuminémie. Ces résultats suggèrent que les isomères de CLA produits par les souches bactériennes testées ont un effet modulateur sur le métabolisme lipidique, tout comme ils exercent un effet anti-oxydant et anti-inflammatoire.

Conclusion Générale

Conclusion Générale

La thématique développée dans cette thèse est partie de l'hypothèse qui stipule, d'une part, que certaines bactéries lactiques probiotiques étaient capables de bioconvertir l'acide linoléique en le conjuguant en ses isomères dont la nature et le nombre dépendent de la souche bactérienne, et d'autre part, que ces isomères de l'acide linoléique conjugué (CLA) ont des propriétés biologiques intéressantes comme les propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anti-obésité.

Le protocole exécuté dans ce travail s'est fixé comme objectif, d'abord, la mise en évidence de cette bioconversion bactérienne de l'acide linoléique *in vitro* et *in vivo* par des souches lactiques (*Lactobacillus rhamnosus* qui est une souche expérimentale et *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* qui est une souche de référence), et ensuite, la démonstration de ces propriétés biologiques *in Vitro* chez des rats mâles Wistar à obésité nutri-induite par un régime hyper-gras.

Les résultats obtenus dans la première partie de ce travail indiquent clairement que les deux souches testées avaient la capacité de croître en présence de l'acide linoléique qui exerce une légère inhibition qui ne se répercute pas sur l'activité acidifiante. Les souches ont démontré leur pouvoir de convertir *in vitro* l'acide linoléique en ses principaux isomères qui sont au nombre de 5. Cette capacité a été plus prononcée chez la souche *L. rhamnosus* par rapport à la souche *B. animalis* subsp *lactis*. En effet, *L. rhamnosus* arrive à convertir plus de 44% de l'acide linoléique présent dans le milieu de culture et à produire 0.135 mg/mL d'isomères d'acide linoléique conjugué (CLA) représentés majoritairement par l'isomère t11, c15-CLA et d'une façon moindre par l'isomère c9, t11-CLA.

Dans une seconde partie, nous avons procédé à une étude *in Vivo* chez des rats Wistar mâles où il a fallu :

- D'abord, démontrer l'implantation et la colonisation du tube digestif de ces rats par les deux souches retenues pour l'étude : *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. animalis* subsp *lactis* Bb12 ;
- Ensuite, vérifier qu'elles gardent leur pouvoir de production *in Vivo* d'isomères de CLA ;
- Et enfin, mettre en évidence les effets *in Vivo* de ces isomères de CLA sur le stress oxydatif, l'homéostasie lipidique et glucidique et l'inflammation chez des rats à obésité nutri-induite par un régime alimentaire hyper-gras.

L'analyse microbiologique des crottes a confirmé que les deux souches de l'étude parviennent à s'implanter et à coloniser le tube digestif des rats à obésité nutri-induite par un régime hyper-gras.

L'analyse CPG des profils lipidiques a révélé que les souches étudiées ont conservé leur potentiel de conversion *in Vivo* de l'acide linoléique en ses isomères dont le niveau atteint est de l'ordre de $6,4 \times 10^{-2}$ mg/mL et $9,4 \times 10^{-2}$ mg/mL pour *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. animalis* subsp *lactis* Bb12, respectivement ; alors que celui chez les rats témoins (ne recevant pas de souches) ne dépassait pas les 8.10^{-3} mg/mL.

Ensuite, les effets biologiques des isomères bactériens de CLA produits ont été mis en évidence chez les rats Wistar à obésité nutri-induite par un régime hyper-gras.

Les observations faites ont montré que les isomères bactériens de CLA produits par les deux souches probiotiques induisent une réduction de la masse corporelle des animaux, ainsi que du poids de leur tissus adipeux.

Par ailleurs, exceptée la triglycéridémie, les taux plasmatiques de glucose, cholestérol total et des lipoprotéines HDL et LDL ont été normalisés chez les rats gavés par les souches bactériennes et supplémentés par de l'acide linoléique ; contrairement aux rats témoins (n'ayant reçu ni souche, ni acide linoléique, ni la combinaison des deux) chez lesquels il y a persistance des troubles de l'homéostasie glucidique et lipidique provoqués par le régime hyper-gras.

Il apparaît ainsi que l'effet anti-obésité observé chez les rats des groupes ayant reçu un régime hyper-gras a été plus prononcé avec la souche *L. rhamnosus* LBRE-LSAS qui a produit l'isomère connu par son effet anti-obésité (trans-10, cis-12-CLA). Cependant, il est probable que d'autres isomères de CLA pourraient être également impliqués dans cet effet anti-obésité.

Un autre volet de la présente expérimentation a été consacré à l'étude des effets des isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA), produits par les deux souches probiotiques LBRE-LSAS et Bb12 sur les tissus hépatique et adipeux des rats Wistar nourris avec un régime hyper-gras. Les résultats obtenus montrent que les foies de ces rats gavés par *L. rhamnosus* LBRE-LSAS ou *B. animalis* subsp *lactis* Bb12 n'ont pas développé de stéatose hépatique contrairement aux rats du lot soumis au même régime mais non gavé par les souches (témoin) qui l'ont développé. Le profil lipidique (triglycérides et cholestérol) des foies et des tissus adipeux des rats a été normalisé, spécialement chez les rats gavés par la souche *L. rhamnosus* LBRE-LSAS.

Ces résultats montrent que les souches productrices d'isomères de CLA, *L. rhamnosus* LBRE-LSAS et *B. animalis* subsp *lactis* Bb12 ont une forte capacité de modulation du métabolisme lipidique et de prévention contre la stéatose hépatique chez les rats obèses.

La dernière expérience de ce travail a consisté à explorer les effets antioxydants et anti-inflammatoires des isomères de l'acide linoléique conjugué produits par les deux souches probiotiques de l'étude sur des rats Wistar mâles à obésité nutri-induite par un régime hyper-gras.

Dans ce contexte, les isomères de CLA produits par les souches, et en particulier par *Lactobacillus rhamnosus*, ont eu pour effet d'éviter l'augmentation du taux de malonaldéhyde, et par contre d'élever significativement ($p < 0.05$) l'activité des enzymes antioxydantes comme celle de la superoxyde dismutase et de la catalase chez les rats à obésité nutri-induite par un régime hyper-gras.

Par ailleurs, le taux des prostaglandines E2 a été significativement réduit chez les animaux traités. Ces résultats montrent que les souches productrices d'isomères de CLA, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS et *Bifidobacterium animalis* Bb12 ont un effet de réduction du stress oxydatif et de prévention de l'inflammation chez le modèle rat à obésité nutri-induite par un régime hyper-gras.

Perspectives :

En perspective, ce travail pourrait être approfondi par :

- La sélection d'autres souches bactériennes à statut probiotique et à haut potentiel producteur de CLA.
- L'étude de l'effet des différents CLA bactériens sur le syndrome métabolique avec une focalisation sur la stéatose hépatique non alcoolique.
- L'exploration des propriétés immunomodulatrices des CLA

Références Bibliographiques

- A -

1. Abd El-Salam M.H, El-Shafie K., Sharaf O.M., Effat B.A., Asem F., El-Aasar M. (2010). Screening of some potentially probiotic lactic acid bacteria for their ability to synthesis conjugated linoleic acid. *Int. J. Dairy Technol.* 63 : 62–69.
2. Aebi H.(1974). Catalase. In: Bergmeyer HV, editor. *Methods in enzymatic analysis*. 2, New York: Academic press.674-84.
3. Ahmad S., Beg Z.H. (2016). Evaluation of therapeutic effect of omega-6 linoleic acid and thymoquinone enriched extracts from *Nigella sativa* oil in the mitigation of lipidemic oxidative stress in rats. *Nutrition*. doi: 10.1016/j.nut.2015.12.003.
4. Ahmed S.T., Hoon J., Mun H.S., Yang C.J. (2014). Evaluation of *Lactobacillus* and *Bacillus*-based probiotics as alternatives to antibiotics in enteric microbial challenged weaned piglets. *African Journal of Microbiology Research*. 8(1) : 96-104.
5. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; (2005). IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 366:1059-62.
6. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. (2009). International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 120:1640-5.
7. Albers R., van der Wielen R.P., Brink E.J., Hendriks H.F., Dorovska-Taran V.N., Mohede I.C. (2003). Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. *Eur J Clin Nutr*. 57:595–603
8. Albin, S., Agrwal, S. (2014). Prevalence and characteristics of reported penicillin allergy in an urban outpatient adult population. *Allergy Asthma*. 35(6): 489–494.
9. Alfaia C.M., Alves S.P., Pestana J.M., Madeira M.S., Moreira O., Santos-Silva J., Bessa R.J., Toldrá F., Prates J.A. (2016). Distinct fatty acid composition of some edible by-products from bovines fed high or low silage diets. *Food Sci. Technol. Int.* 1082013216674137.
10. Allison, M. B., & Myers, M. G. (2014). Connecting leptin signaling to biological function. *Journal of Endocrinology*, 223(1), T25-T35. DOI: 10.1530/JOE-14-0404.
11. Alonso L., Cuesta E.P., Gilliland S.E. (2003) Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. *Journal of Dairy Science*. 86: 1941-1946.
12. Alphonsus C.S., Rodseth R.N. (2014). The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia*. 69: 777–84.
13. Amara A. A., Shibl A. (2015). Role of probiotic in health improvement infection control and disease treatment and mangement. *Saudi pharmaceutical Journal*. 23 : 107-114
14. Aragón F., Carino S., Perdígón G., de Moreno de LeBlanc A. (2014). The administration of milk fermented by the probiotic *Lactobacillus casei* CRL 431 exerts an immunomodulatory effect against a breast tumour in a mouse model. *Immunobiology*. 219 (6):457-64.
15. Artigas A., Wernerman J., Arroyo V., Vincent J.L., Levy M. (2016). Role of albumin in diseases associated with severe systemic inflammation: Pathophysiological and clinical evidence in sepsis and in decompensated cirrhosis. *Journal of Critical Care*. doi: 10.1016/j.jcrc.2015.12.019.

16. Azain MJ, Hausman DB, Sisk MB, Flatt WP, Jewell DE (2000) Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J Nutr* 130(6), 1548-1554

-B-

17. Babaei Z., Moslemi D., Parsian H., Khafri S., Pouramir M., Mosapour A. (2015). Relationship of obesity with serum concentrations of leptin, CRP and IL-6 in breast cancer survivors. *J Egyptian Nat Cancer Inst.* 27(4):223-9.
18. Badimon L., Oñate B., Vilahur G. (2015). Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells and Their Reparative Potential in Ischemic Heart Disease. *Rev. Esp. Cardiol. Engl. Ed* 68, 599–611.
19. Bajaj S, Singh R.P., Dwivedi N.C., Singh K, Gupta A, Mathur M. (2014). Vitamin D levels and microvascular complications in type 2 diabetes. *Indian J Endocrinol Metab.* 18(4):537-41.
20. Balkau B, Charles MA. (1999). Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet Med.* 16: 442-3.
21. Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, et al. (2002). European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab.* 28:364-76.
22. Banni S. (2002). Conjugated linoleic acid metabolism. *Current opinion in lipidology*, 3,261-6.
23. Barrett, E., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. (2007) Rapid screening method for analyzing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures. *Appl Environ Microbiol* 73:2333-2337.
24. Barry, A., Mizock, M.D., FACP., FCCM. (2015). Probiotics. *Disease of Month.* 61: 259-290.
25. Basdevant A., Clément K., Oppert J.M. (2014). Vers de nouveaux phénotypes et de nouvelles nosographies: de l'obésité aux maladies du tissu adipeux. *Cahiers de Nutrition et de Diététique.* 49 (3): 104-112.
26. Bassaganya-Riera, J., Viladomiu, M., Pedragosa, M., De Simone, C., Carbo, A., Shaykhtudinov, R., Jobin, C., Arthur, J.C., Corl, B.A. and Vogel, H. (2012) Probiotic bacteria produce conjugated linoleic acid locally in the gut that targets macrophage PPAR γ to suppress colitis. *PLoS One* 7, e31238.
27. Basu S., Smedman A., Vessby B. (2000). Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Letters.* 468 : 33–36.
28. Basiricò L., Morera P., Dipasquale D., Tröscher A., Bernabucci U. (2017). Comparison between conjugated linoleic acid and essential fatty acids in preventing oxidative stress in bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 100:1–11. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11729>.
29. Bauer, P., Horlacher, P. & Claus, P. (2009): Direct isomerization of linoleic acid to conjugated linoleic acid using gold catalyst. *Chem. Engng Technol.*, 32, 2005-2010.
30. Bays H. (2014). Central obesity as a clinical marker of adiposopathy; increased visceral adiposity as a surrogate marker for global fat dysfunction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 21(5): 345-351.
31. Belkaid, Y., and Hand, T.W. (2014). Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell* 157, 121–141.
32. Beg M.S., Saleem S., Turer A., Ayers C., de Lemos J.A., Khera A., Scherer P.E., Lakoski S. (2015). A Prospective Analysis of Plasma Adiponectin and Risk of Incident Cancer: The Dallas Heart Study. *J Natl Compr Canc Netw.* 13(7): 873-878.
33. Belury M.A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr.* 22 : 505-531.
34. Bendriss L., Lebbaq A., Jallal H., Mrani S., Khatouri A. (2012). Usefulness of microalbuminuria in the metabolic Syndrome as a predictor of cardiovascular disease. Prospective study about 78 cases. *Annales de cardiologie et d'angéiologie.* 61(1) : 15- 19.

35. Bergman R.N., Stefanovski D., Buchanan T.A., Sumner A.E., Reynolds J.C., Sebring N.G., Xiang A.H., Watanabe R.M. (2011). A better index of body adiposity. *Obes. Silver Spring Md.* 19: 1083–1089.
36. Bertelsen R.J., Brantsæter A.L., Magnus M.C., Haugen M., Myhre R., Jacobsson B., Longnecker M.P., Meltzer H.M., London S.J. (2014). Probiotic milk consumption in pregnancy and infancy and subsequent childhood allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 133(1): 165-71.
37. Bialek A., Zagrodzki P. & Tokarz A. (2016). Chemometric analysis of the interactions among different parameters describing health conditions, breast cancer risk and fatty acids profile in serum of rats supplemented with conjugated linoleic acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 106, 1-10.
38. Boirie Y., Farigon N., Miolanne M., Montel F., Lahaye C., Guillet C., Walrand S. (2016). L'obésité sarcopénique : causes et conséquences Sarcopenic obesity: Causes and consequences. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. Doi : 10.1016/j.cnd.2015.12.002.
39. Bonnefont-Rousselot D. (2013). Obésité et stress oxydant. *Obésité.* 9 (1) : 8-13.
40. Booth A, Magnuson A, Fouts J, Foster M. (2015). Adipose tissue, obesity and adipokines: role in cancer promotion. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 21(1): 57-74.
41. Borniquel, S., Jadert, C., & Lundberg, J. O. (2012). Dietary conjugated linoleic acid activates PPAR γ and the intestinal trefoil factor in SW480 cells and mice with dextran sulfate sodium-induced colitis. *Journal of Nutrition*, 142(12), 2135–2140.
42. Buisson A., Ordiz F., Pellizzon M., Jen K-L. C. (2000). Conjugated linoleic acid does not impair fat regain but alters igf-1 levels in weight-reduced rats. *Nutr. Res.* 20 : 1591-1601.
43. Butel M.J. (2014). Probiotic gut microbiota and health. *Medecine et maladies infectieuses.* 1:1-8
44. Brown J.M., Boysen M.S., Jensen S.S., Morrison R.F., Storkson J., Lea-Currie R., Pariza M., Mandrup S., McIntosh M.K. (2003). Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR γ signaling by CLA in human preadipocytes. *Journal of Lipid Research.* 44 (7): 1287-1300.
- C-
45. Caggia, C., De Angelis, M., Pitino, I. et Randazzo, C.L. (2015). Probiotic features of lactobacillus strains from Ragusano and pecorino siciliano cheses. *Food microbiology.* 50 : 109-117
46. Castro-Webb, N., Ruiz-Narvaez, E. A., & Campos, H. (2012). Crosssectional study of conjugated linoleic acid in adipose tissue and risk of diabetes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96(1), 175–181.
47. Chavez-Tapia N., Torres-Sanchez J., Romero-Flores J., Alvez,-Quioz P., Ramirez-Alvarez S., Uribe, M. (2015). Prevalence invulnerable Population of liver Fibrosis Identified by Transient Elastography. *Annal of Hepatology.* 4 : 524-530
48. Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H., & Chen, W. (2014). Oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* CCFM0528 improves glucose tolerance and cytokine secretion in high-fat-fed, streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. *Journal of Functional Foods.* 10, 318–326.
49. Chin S.F., Storkson J.M., Liu W., Albright K.J., Pariza M.W. (1994). Conjugated linoleic acid (9,11- and 10,12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. *Journal of Nutrition*, 124 , 694–701.
50. Chinnadurai K., Kanwal H.K., Tyagi A.K., Stanton C., Ross P. (2013). High conjugated linoleic acid enriched ghee (clarified butter) increases the antioxidant and antiatherogenic potency in female Wistar rats. *Lipids in Health and Disease.* 12:121
51. Chiu I. M., Heesters B. A., Ghasemlou N., Von Hehn C. A., Zhao F., Tran J., et al. (2014). Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation. *Nature.* 501, 52–57 10.1038/nature12479.

52. Churrua, I., Fernández-Quintela, A. and Portillo, M.P. (2009) Conjugated linoleic acid isomers: differences in metabolism and biological effects. *Biofactors* 35, 105-111.
53. Clement L, Poirier H, Niot I, et al. (2002) Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res* 43(9), 1400-1409.
54. Coakley, M., Ross, R.P., Nordgren, M., Fitzgerald, G., Devery, R. and Stanton, C. (2003) Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived Bifidobacterium species. *Journal of applied microbiology*. 94, 138-145.
55. Cohen J.C., Horton J.D., Hobbs H.H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. 332:1519-23.
56. Choi NJ, Park HG, Kim YJ, Kim IH, Kang HS, Yoon CS, et al.(2008). Utilization of monolinolein as a substrate for conjugated linoleic acid production by Bifidobacterium breve LMC 520 of human neonatal origin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. ;56(22):10908-12.
57. Cooke A.A., Connaughton R.M., Lyons C. L., McMorrow M.A, Roche H.M. (2016). Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. *European Journal of Pharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.021>.
58. Corino C., Mourot J., Magni S., Pastorelli G., Rosi F. (2002). Influence of dietary conjugated linoleic acid on growth, meat quality, lipogenesis, plasma leptin and physiological variables of lipid metabolism in rabbits. *J Anim Sci*. 80(4):1020-1028.
59. Couillard C., Mauriege P., Imbeault P., Prud'homme D., Nadeau A., Tremblay A., Bouchard C., Despres J.P. (2000). Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 24(6): 782788.
60. Council of European Communities (1986). Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations. Official journal of the European Communities. (JO 86/609/CEE) 358 : 1-28.
61. Coutinho Tde A., Tunner S.T., Peyser P.A., Bielak L.F., Sheedy P.F., Kullo I.J. (2007). Associations of serum uric acid with markers of inflammation, metabolic syndrome, and subclinical coronary atherosclerosis. *Am J Hypertens* . 20 : 83-89.
62. Crepaldi G., Maggi S. (2006). The metabolic syndrome : a historical context. *Diabetes Voice*, 51, 8-10.
63. Crespi E., Bottai G., Santaripa L. (2016). Role of inflammation in obesity-related breast cancer. *Current opinion in pharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2016.11.004>.
64. Cuello-Garcia C.A., Brožek J.L., Fiocchi A., Pawankar R., Yepes-Nuñez J.J., Terracciano L., Gandhi S., Agarwal A., Zhang Y., Schünemann H.J. (2015). Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Allergy Clin Immunol*. 136(4) :952-61
- D-**
65. Daley, A. Abbott, P.S. Doyle, G.A. Nader, S. Larson. ((2010) . A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef, *Nutr. J*. 9 10.
66. De Champs C., Maroncle N., Balestrino D., Rich C., & Forestier C. (2003). Persistence of Colonization of Intestinal Mucosa by a Probiotic Strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after Oral Consumption. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1270–1273
67. DeClercq V., Zahradka P., Taylor G.C. (2010). Dietary t10,c12-CLA but not c9,t11 CLA reduces adipocyte size in the absence of changes in the adipose renin-angiotensin system in fa/fa Zucker rats. *Lipids*. 45(11): 1025-1033.

68. DeLany JP, Blohm F, Truett AA, Scimeca JA, West DB (1999) Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am J Physiol* 276(4 Pt 2), R1172-9.
69. DeMan J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.
70. Devillard E., McIntosh F. M., Duncan S. H. & Wallace R. J. (2007). Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: Different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. *Journal of Bacteriology*, 189, 2566–2570
71. Dianóczki, C., Kövári, J., Novák, L. & Poppe, L. (2010): *Method for the preparation of conjugated linoleic acid*. European Patent EP1709144.
72. Dierick, N.A., Decuyper, J.A., Molly, K., van Beek, E. and Vanderbeke, E. (2002) The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition - I. In vitro screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets. *Livest Prod Sci* 75, 129-142.
73. Dilzer A., Park Y. (2012). Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 52 (6): 488-513
74. Divella R., De Luca R., Abbate I., Naglieri E., Daniele A. (2016). Obesity and cancer: the role of adipose tissue and adipo-cytokines-induced chronic inflammation. *J Cancer*. 7(15): 2346–2359.
75. Divoux A., Tordjman J., Lacasa D., Veyrie N., Hugol D., Aissat A., et al. (2010). Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes*. 59: 2817-25.
76. Doyle E. (1998). Scientific forum explores CLA knowledge. *Inform* 9: 69–73.
77. Doyle L, Jewell C, Mullen A, Nugent AP, Roche HM, Cashman KD (2005) Effect of dietary supplementation with conjugated linoleic acid on markers of calcium and bone metabolism in healthy adult men. *Eur J Clin Nutr* 59(3), 432-440.
78. Doustmohamadiana S., Serahatib S., Barzinb M., Keihanib S., Azizic F. , Hosseinpanah F. (2016). Risk of all-cause mortality in abdominal obesity phenotypes: Tehran Lipid and Glucose Study. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2016.11.123>.
79. Draper H.H., Hadley M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 186:421-31.
80. Druart, C., Dewulf, E., Cani, P., Neyrinck, A., Thissen, J.-P., & Delzenne, N. (2014). Gut microbial metabolites of polyunsaturated fatty acids correlate with specific fecal bacteria and serum markers of metabolic syndrome in obese women. *Lipids*, 49(4), 397–402.
64. Durgam V.R., Fernandes G. (1997). The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. *Cancer Lett*. 116: 121–130.
- E-
81. Eftekhari M.H., Aliasghari F., Babaei-Beigi M.A., Hasanzadeh J. (2013). Effect of conjugated linoleic acid and omega-3 fatty acid supplementation on inflammatory and oxidative stress markers in atherosclerotic patients. *ARYA Atheroscler*. 9(6) : 311–318.
82. Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH, et al. (2003). American College of Endocrinology, position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr Pract*. 9: 237-52.
83. El Roz, J.M. Bard, J.M. Huvelin, H. Nazih, The anti-proliferative and proapoptotic effects of the trans9, trans11 conjugated linoleic acid isomer on MCF-7 breast cancer cells are associated with LXR activation, Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 88 (2013) 265–272.

Endo, Y., Kamisada, S., Fujimoto, K. and Saito, T. (2006) Trans fatty acids promote the growth of some Lactobacillus strains. J Gen Appl Microbiol .52: 29-35.

84. Ettinger S. (2017). Obesity and Metabolic Syndrome. Nutritional Pathophysiology of Obesity and its Comorbidities, 1- 26; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803013-4.00001-6>.

Evans M, Geigerman C, Cook J, Curtis L, Kuebler B, McIntosh M (2000) Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. Lipids 35(8), 899-910.

85. Evans M., Park Y., Pariza M., Curtis L., Kuebler B., McIntosh M. (2001). Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid reduces triglyceride content while differentially affecting peroxisome proliferator activated receptor gamma2 and aP2 expression in 3T3-L1 preadipocytes. Lipids. 36 (11): 1223-1232.

86. Evans, N.P., Misyak, S.A., Schmelz, E.M., Guri, A.J., Hontecillas, R. and Bassaganya-Riera, J. (2010). Conjugated linoleic acid ameliorates inflammation-induced colorectal cancer in mice through activation of PPARgamma. J Nutr. 140, 515-521.

87. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y., Derrien M., Muccioli G.G., Delzenne N.M., de Vos W.M., Cani P.D. (2013). Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. Proc Natl Acad Sci USA. 110:9066–9071.

88. Ewaschuk J.B., Walker J.W., Diaz H., Madsen K.L. (2006). Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice. J. Nutr. 136: 1483-1487

89. Expert Panel on Detection. (2001). Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report on the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). JAMA. 285: 2486-97.

-F-

90. FAO/OMS : organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, organisation Mondiale de la santé .FAO/WHO (2002). Drafting guidelines for the evaluation of probiotics in foods.

91. FAO/ WHO. (2008). World Health Organization. Fats and Fatty Acids in Human Nutrition, report of an expert consultation; FAO Food and Nutrition Paper, Geneva, Switzerland.

92. Fukuda S., Suzuki Y., Murai M., Asanuma N., Hino T. (2006). Isolation of a novel strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that isomerizes linoleic acid to conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a probiotic for animals. J. Appl. Microbiol. 100, 787-794.

93. Farmani J., Safari M., Roohvand F., Razavi S. H., Aghasadeghi M. R. & Noorbazargan H. (2010). Conjugated linoleic acid-producing enzymes: Abioinformatics study. European Journal of Lipid Science and Technology, 112, 1088–1100.

94. Fasshauer M., Blüher M. (2015). Adipokines in health and disease. Trends Pharmacol Sci.36 (7): 461-70.

95. Faucher P., Poitou C. (2015). Physiopathologie de l'obésité. Revue du rhumatisme monographies. <http://dx.doi.org/10.1016/j.monrhu.2015.08.002>.

96. Faure S., Pubert C., Rabiller J., Taillez J., Yvain A. (2013). Internet des probiotiques en préventif au niveau des différents flores de l'organisme. Ed Elsevier Masson SAS. 19.

97. Fearon K.C., Falconer J.S., Slater C., McMillan D.C., Ross J.A., Preston T. (1998). Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response. Annals of Surgery. 227:249–254.

98. Ferramosca A, Savy V, Conte L, et al (2006) Conjugated linoleic acid and hepatic lipogenesis in mouse: role of the mitochondrial citrate carrier. Journal of Lipid Research 47:1994–2003.

99. Ferrini G.; Baucells M.D.; Esteve-Garcia E. & al. (2008). Dietary polyunsaturated fat reduces skin fat as well as abdominal fat in broiler chickens. *Poultry Science*, 87, 528-535.
100. Fernandez-Figares, I., Lachica, M., Martín, A., Nieto, R., Gonzalez- Valero, L., Rodriguez-López, J. M., & Aguilera, J. F. (2012). Impact of dietary betaine and conjugated linoleic acid on insulin sensitivity, protein and fat metabolism of obese pigs. *Animal*, 6(07), 1058–1067.
101. Florence, A.C.R., Béal,C.,DA silva, R.C., Oliveira, M.N.(2014). Survival of three *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains is related to *trans*-vaccenic and α -linolenic acids contents in organic fermented milks. *Food Science and Technology* 56, (2) : 290–295.
102. Flowers M., Thompson P. A. (2009). t10c12 Conjugated Linoleic Acid Suppresses HER2 Protein and Enhances Apoptosis in SKBr3 Breast Cancer Cells: Possible Role of COX2. *PLoS ONE*. 4(4) : e5342.
103. Ftouhi B., Zidi W., Elasmı M., Zayani Y., Ounifi S., Slimen H., Kaabachi N. (2010). P263 Taux de C-Reactive Proteine et Syndrome métabolique. *Diabetes & metabolism*, 36, A101.
104. Fuller, R. (1989). Probiotics in man and Animals. A review. *journal of Applied . Bacteriology* .66 : 365-378
105. Fukuda S., Suzuki Y., Murai M., Asanuma N. & Hino T. (2006.) Isolation of a novel strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that isomerizes linoleic acid to conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a probiotic for animals. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 787-94.
- G-**
106. Gao, Y., Li, D. et Liu, X.(2015).Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* C2 as starter culture in fermented sausage . *Journal of Food control*, (1) :1-6
107. Gangidi, R.R. & Proctor, A. (2004): Photochemical production of conjugated linoleic acid from soybean oil. *Lipids*, 39, 577-582.
108. Gilbert,W., Gadang, V., Proctor, A., Jain, V., & Devareddy, L. (2011). Trans-trans conjugated linoleic acid enriched soybean oil reduces fatty liver and lowers serum cholesterol in obese Zucker rats. *Lipids*, 46(10), 961–968
109. Giorgieva, M., Staraeva, P., Uzumova, K., Efremov, T., Balachev, K., Harata, et Milochero, G.(2015) . The linker histone in *Saccharomyces cerevisiae* interacts with actin-related protein 4 and both regulate chromatin structure and cellular morphology. *Int J Biohem cell Biol* 59 : 92 – 182.
110. Gorissen L, Raes K, Weckx S, Dannenberger D, Leroy F, De Vuyst L, De Smet S. Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by *Bifidobacterium* species. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010. 87:2257–2266
111. Gorissen L. De Vuyst K. Raes S. De Smet F. Leroy. (2012). Conjugated linoleic and linolenic acid production kinetics by bifidobacteria differ among strains, *Int. J. Food Microbiol*. 155 234–240.
112. Gorissen L., Leroy F., De Vuyst L., De Smet S. & Raes K. (2015). Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: a technological challenge. *Critical Review in food science and nutrition*, 11, 1561-1574.
113. Gozalbez, L. et Ramon. (2015). Probiotics in transition : novel strategies .*Journal of Trends in biotechnology*, (4) :195-196.
114. Groeger A.L., Cipollina C., Cole M.P., Woodcock S.R., Bonacci G., Rudolph T.K., Rudolph V., Freeman B.A., Schopfer F.J. (2010). Cyclooxygenase-2 generates anti-inflammatory mediators from omega-3 fatty acids, *Nat Chem Biol*. 6 :433-441.
115. Granlund L, Pedersen JI, Nebb HI (2005) Impaired lipid accumulation by trans10, cis12 CLA during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. *Biochimica and Biophysica Acta* 1687(1-3): 11-22.

116. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, et al. (2004). American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 109 : 433-8.
117. Guida S., Venema M. (2015). Gut microbiota and obesity: Involvement of the adipose tissue. *Journal of Functional Foods*. (14): 407–423.
118. Guo, L., karpac,J.,Trans,S.L.,Jasper,H.(2015).PGRP-SC2 promotes Gut Homeostasis of limit commensal Dysbiosis and extend Lifespan.*Cell* 156(1-2) :109- (Expant to R/S)
119. Gupta D., Lis C.G. (2010). Pretreatment serum albumin as a predictor of cancer survival: a systematic review of the epidemiological literature. *Nutr. J.* 9, 69–85.
- H-**
120. Ha Y. L., N. K. Grimm & M. W. Pariza. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: Heat altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, 8, 1881-1887.
121. Halada P., Miranda J., Chyrruca I., Fernandez-Quintela A., Rodriguez V.M. & Portillo M.P. (2006). Effects of trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on body fat and serum lipids in young and adult hamsters. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 62, 81–87.
122. Halade, G. V., Rahman, M. M., & Fernandes, G. (2010). Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57Bl/6J mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(4): 332–337.
123. Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutrition Reviews*. 52 : 253–265.
124. Hennessy A.A., Ross R.P., Stanton C., Devery R., Murphy, J.J. (2007) Development of dairy based functional foods enriched in conjugated linoleic acid with special reference to ruminic acid. In *Functional Dairy Products*, Volume 2 ed. Saarela, M. pp.443-495.
125. Henriksen E.J., Teachey M.K., Taylor Z.C., Jacob S., Ptock A., Kramer K., Hasselwander O. (2003). Isomer-specific actions of conjugated linoleic acid on muscle glucose transport in the obese Zucker rat. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 285, 98-105
126. Hernandez-Mendoza A., Lopez-Hernandez A., Hill C. G. & Garcia H. S. (2009). Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Lactobacillus reuteri* under different growth conditions. *Journal of Chemistry Technnology and Biotechnology*, 84, 180–185.
127. Holowacz, S., Guigné,C., Chene,G., Mouysset, S., Guilbot, A., Seyring,C., Dubourdeau,M.(2015). A multispecies *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing probiotic mixture attenuates body weight gain and insulin resistance after a short-term challenge with a high-fat diet in C57/BL6J mice. *PharmaNutrition*. doi:10.1016/j.phanu.2015.03.003
128. Hong M., Woo Kim, S., Hak Han,S., Joon Kim, D., Suk,K., Soo Kim,Y., Kim, M.J. ,
129. Houseknecht K.L., Vanden Heuvel J.P., Moya-Camarena S.Y., Portocarrero C.P., Peck L.W., Nickel K.P., Belury M.A. (1998) Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 244 (3) : 678-682.
130. Hu X, Li Y, Li C, Fu Y, Cai F, Chen Q, Li D (2012) Combination of fucoxanthin and conjugated linoleic acid attenuates body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced obese rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 519(1) : 59–65.
131. Huang C.J., McAllister M.J., Slusher A.L., Webb H.E.,Mock J.T., Acevedo E.O. (2015). Obesity-Related Oxidative Stress: the Impact of Physical Activity and Diet Manipulation. *Sports Med Open*. 1- 32.
132. Huang, H., Kawamata, T., Horie, T., Tsugawa, Y., Ohsumi, Y., Fukusaki, E. (2015). Bulk RNA degradation by nitrogen starvation- induced autophagy in yeast. *EMBOJ. Journal of genome database*. 34(2) : 154-168

133. Huang, H.Y., Hsieh, H.Y., King, V., Chi, L. et Tsen, J. (2014). Topre-challenge lactic acid bacteria with simulated gastrointestinal conditions is a suitable approach to studying potential probiotic properties. *Microbiological Methods*. 107: 138-146.

134. Hur S.J., Kim H.S., Bahk Y.Y., Park Y. (2016). Overview of conjugated linoleic acid formation and accumulation in animal products. *Livestock Science*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2016.11.016>

-I-

135. Ide T. (2005). Interaction of fish oil and conjugated linoleic acid in affecting hepatic activity of lipogenic enzymes and gene expression in liver and adipose tissue. *Diabetes*. 54:412–423.

136. Ishimwe N., Daliri E., Lee B., Fang F., Du G. (2015). The perspective on cholesterol-lowering mechanisms of probiotics *Mol. Nutr. Food Res*. 59 pp. 94–105

-J-

137. Jain, V.P., Proctor, A. & Lall, R. (2008): Pilot-scale production of conjugated linoleic acid-rich soy oil by photoirradiation. *J. Fd Sci.*, 73, 183-192.

138. Jenkins, J.K. and Courtney, P.D. (2003) *Lactobacillus* growth and membrane composition in the presence of linoleic or conjugated linoleic acid. *Can J Microbiol* 49, 51-57.

139. Ji OH, Y, Sun Jung, D. (2015). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from Omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. *Food science and technology*. 63 (1) : 437–444.

140. Jenkins T. C. (2010). Common analytical errors yielding inaccurate results during analysis of fatty acids in feed and digesta samples. *Journal of Dairy Science*. 3: 1170–1174.

141. Jiang J, Bjorck L, Fonde'n R (1998) Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *Journal of Applied Microbiology* 85 : 95 – 102.

142. Jonkers D. M. A. E. (2016). Microbial perturbations and modulation in conditions associated with malnutrition and malabsorption. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*. 30:161–172.

-K-

143. Kadooka, Y., Sato, M., Imaizumi, K., Ogawa, A., Ikuyama, K., Akai, Y., Okano, M., Kagoshima, M., & Tsuchida, T. (2010). Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, 636– 643.

144. Kaleem M., Farizon Y., Enjalbert F. & Troegeler-Meynadier A . (2013) Lipid oxidation products of heated soybeans as a possible cause of protection from ruminal biohydrogenation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 161-169.

145. Kamlage B., Hartmann L., Gruhl B., & Blaut M. (1999). Intestinal microorganisms do not supply associated gnotobiotic rats with conjugated linoleic acid. *Journal of Nutrition*, 129, 2212–2217.

146. Kankaanpää P., Yang B., Kallio H., Isolauri E., Salminen S. (2004) Effects of polyunsaturated fatty acids in growth medium on lipid composition and on physicochemical surface properties of lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 70, 129-136.

147. Kang K., Liu W., Albright K.J., Park Y., Pariza M.W. (2003). trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. *Biochem Biophys Res Commun* 303(3): 795-799.

148. Kang H.K., Kim C.H. (2016). Effects of dietary supplementation with rice bran oil on the growth performance, blood parameters, and immune response of broiler chickens. *J. Anim. Sci. Technol*. 58, 1.

149. Kaplan N.M. (1989). The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*, 149(7), 1514–1520.

150. Kelley D.S., Bartolini G.L., Warren J.M., Simon V.A., Mackey B.E & Erickson K.L.(2004). Contrasting Effects of t10,c12- and c9,t11-Conjugated Linoleic Acid Isomers on the Fatty Acid Profiles of Mouse Liver . *Lipids*, 2, 135-41.
151. Kennedy, A., Martinez, K., Chung, S., LaPoint, K., Hopkins, R., Schmidt, S. F., Andersen, K., Mandrup, S., & McIntosh, M. (2010). Inflammation and insulin resistance induced by trans- 10, cis-12 conjugated linoleic acid depend on intracellular calcium levels in primary cultures of human adipocytes. *Journal of Lipid Research*, 51(7), 1906–1917.
152. Khan, M.T., Nieuwdorp, M., and Bäckhed, F. (2014). Microbial modulation of insulin sensitivity. *Cell Metab.* 20, 753–760.
153. Kiernan J.A. (1990). *Histological and Histochemical Methods: theory and practice*. Pergamon Press, New York.
154. Kim Y.Z., Lui R.H., Bond D.R., Russel J.B. (2000). Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid produced by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 5226-5230.
155. Kim H. K., Kim S. R., Ahn J. Y., Cho I. J., Yoon C. S., Ha T. Y. (2005). Dietary conjugated linoleic acid reduces lipid peroxidation by increasing oxidative stability in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 51 : 8–15.
156. Kim J. H., Pan J. H., Park H. G., Yoon H. G., Kwon O. J., Kim T. W., Shin D. H., & Kim Y. J. (2010). Functional comparison of esterified and free forms of conjugated linoleic acid in highfat- diet-induced obese C57BL/6J mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11441–11447.
157. Kim, D. I., Kim, K. H., Kang, J. H., Jung, E. M., Kim, S. S., Jeung, E. B., & Yang, M. P. (2011). Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid modulates NF- κ B activation and TNF- α production in porcine peripheral blood mononuclear cells via a PPAR γ -dependent pathway. *The British Journal of Nutrition*, 105(9), 1329–1336.
158. Kim M. J., Pelloux V., Guyot E., et al. (2012). Inflammatory pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells. *Environ Health Perspect.* 120:508–14.
159. Kim S., Taylor J.A., Milne G.L., Sandle D.P. (2013). Prostaglandin E2 Activates YAP and a Positive-Signaling Loop to Promote Colon Regeneration After Colitis but Also Carcinogenesis in Mice. *Gastroenterology*. 152 (3): 616-630.
160. Kim, K. A., Jeong, J. J., & Kim, D. H. (2015). *Lactobacillus brevis* OK56 ameliorates high-fat diet-induced obesity in mice by inhibiting NF- κ B activation and gut microbial LPS production. *Journal of Functional Foods*, 13, 183–191.
161. Kishino S., Ogawa J., Omura Y., Matsumura K., & Shimizu S. (2002). Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *Journal of American Oil Chemist's Society*, 79, 159–163.
162. Kishino S, Ogawa J, Yokozeki K, Shimizu S. (2011). Linoleic acid isomerase in *Lactobacillus plantarum* AKU1009a proved to be a multi-component enzyme system requiring oxidoreduction cofactors. *Biosci Biotechnol Biochem*, 75:122–318
163. Ko Y. H., Yang H. Y., Jang I. S. (2004). Effect of Conjugated Linoleic Acid on Intestinal and Hepatic Antioxidant Enzyme Activity and Lipid Peroxidation in Broiler Chickens. *Aust. J. Anim. Sci.* 17 (8) : 1162-1167.
164. Koba, K., Yanagita, T. (2014). Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obesity Research & Clinical Practice*. 8 : e525—e532

165. Kochamit N., Sirppormadusil S. Sukon p., Sirppormadusil W. (2015) . Antibacterial Activities genotypic characteristic of bacteriocin-producing *Bacillus subtilis* KKU 213 ; potential a probiotic strain . *Journal of national institute of Health*. (170) :36-50
166. Korbecki J., Baranowska-Bosiacka I., Gutowska I., Chlubek D. (2013). The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid, *J Physiol Pharmacol*. 64 : 409-421.
167. Kostogrys R.B., Pisulewski P.M. (2010) Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on lipid profile and liver histology in laboratory rats fed high-fructose diet. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 30: 245-250.
168. Krakauer N.Y., Krakauer J.C. (2012). A new body shape index predicts mortality hazard independently of body mass index. *PLoS One*. 7(7):e39504.
169. Kreider RB, Ferreira MP, Greenwood M, Wilson M, Almada AL (2002) Effects of conjugated linoleic acid supplementation during resistance training on body composition, bone density, strength, and selected hematological markers. *J Strength Cond Res* 16(3), 325-334.
170. Kylin E. (1923). Studienüber das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämie syndrom. *Zentralblatt Inn Med*. 44:105-27.
- L-
171. Laforest S., Labrecque J., Michaud A., et al. (2015). Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 18: 1-13.
172. Laitinen, K., Poussa, T., & Isolauri, E. (2009). Probiotics and dietary counselling contribute to glucose regulation during and after pregnancy: A randomised controlled trial. *British journal of nutrition*, 101, 1679–1687.
173. Lam C.K., Chen J., Cao Y., Yang L., Wong Y.M., Venus Yeung S.Y., Yao X., Huang Y. & Chen Z. (2008). Conjugated and non-conjugated octadecanoic acids affect differently intestinal acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase activity. *Atherosclerosis*, 198, 85–93.
174. Lee S.O., Kim C.S., Kim S.M., Choi H.J., Ji G.E., Oh D.K. (2003) Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol. Lett*. 25: 935-938.
175. Lee H. Y., Park J.H., Seo S.H., Baek M.W., Kim D.J., Lee K.E., Paek K. S., Lee Y. , Park, J.H. (2006). Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761 : 736–744.
176. Lee K., Paek K., Lee H. Y., Park J. H., Lee Y. (2007). Antiobesity effect of trans-10, cis-12- conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 1140-1146.
177. Lee K.M., Jang J.H., Park J.S., Kim D.S. & Han H.S. (2009). Effect of mild hypothermia on blood brain barrier disruption induced by oleic acid in rats. *Genes Genomics*, 31, 89–98.
178. Lehen T.E., da Silva M.R., Camacho A., Marcadenti A., Lehen A.M.. (2015). A review on effects of conjugated linoleic fatty acid (CLA) upon body composition and energetic metabolism. *J Int Soc Sports Nutr*.12:36.
179. Leite, M., Waters, P., Woodhall, M., Vincent, A. (2015).MOG Cell. Based assay detects non-MS patient with Inflammatory Neurologic Disease. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2 : 845-853
180. Leung Y. H., Liu R. H. (2000). Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid isomer exhibits stronger oxyradical scavenging capacity than cis-9,trans11-conjugated linoleic acid isomer. *J. Agric. Food Chem*. 48:5469-5475
181. Li G., Barnes D., Butz D., Bjorling D., Cook, M. E. (2005). 10t,12cConjugated linoleic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase expression in vitro and in vivo. *Journal of Lipid Research*. 46 : 2134–2142

182. Lilly, D.M. et Stillwell, R.H. (1965). Probiotics :Growth-PROMOTING Factors Produced by Microorganisms. *Original Scientific Research*. 3659 : 747-748.

-M-

183. Ma, L., Lengi, A. J., McGilliard, M. L., Bauman, D. E., & Corl, B. A. (2014). Short communication: Effect of trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on activation of lipogenic transcription factors in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 97(8), 5001–5006.

184. Malinska, H.,Huttl,M.,Oliyarnik,O.,Bratova,M.,Kazdova,L.(2015). Conjugated linoleic acid reduces visceral and ectopic lipid accumulation and insulin resistance in chronic severe hypertriacylglycerolemia. *Nutrition* . 31 (7-8) : 1045-1051.

185. Marineli R.D.S., Marques A.C., Furlan C.P.B., Jr M.R.M. (2012). Antioxidant effects of the combination of conjugated linoleic acid and phytosterol supplementation in Sprague–Dawley rats. *Food Research International* 49 : 487–493.

186. Martins, S., Lopes, P., Alves, S., Alfaia, C., Castro, M., Bessa, R. B., & Prates, J. M. (2012). Dietary CLA combined with palm oil or ovine fat differentially influences fatty acid deposition in tissues of obese Zucker rats. *Lipids*, 47(1), 47–58.

187. Martínez-Monteagudo S.I., Leal-D_avila, M., M. Curtis, J. (2015). Oxidative stability of ultra high temperature milk enriched in conjugated linoleic acid and trans-vaccenic acid. *International Dairy Journal* 43 : 70-77.

188. Mangiapane, E., Mazzoli, R., Pessione, A., Severson, B., Riedel, K. et Pessione, E. (2015).Ten years of Subproteome investigations in lactic acid Bacteria : A key for food starter and probiotic typing. *Journal of proteomic*. 2138 :8

189. Matherly S.C. and Puri P. (2012). Mechanisms of Simple Hepatic Steatosis: Not So Simple After All. *Clinical Liver Disease*. 16: 505-524.

190. McGowan, M., Eisenberg, B., Lewis, L., Froehlich, H.,Wells,W., Eastman, A., Kummerle, N., Rosenkrantz, K., Barth, R., Jr., Schwartz, G., Li, Z., Tosteson, T., Beaulieu, B., Jr., & Kinlaw,W. (2013). A proof of principle clinical trial to determine whether conjugated linoleic acid modulates the lipogenic pathway in human breast cancer tissue. *Breast Cancer Research and Treatment*, 138(1), 175–183.

191. McNeel, R.L., Smith, E.O., Mersmann, H.J. (2003). Isomers of conjugated linoleic acid modulate human preadipocyte differentiation. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal*. 39: 375- 382.

192. Mellouk Z., Agustina M., Ramirez M., Pena K., Arivalo J. (2016). Effets thérapeutiques de la supplémentation en huile de krill (*Euphausia superba*) sur les marqueurs du stress oxydant et des dommages de l'ADN chez des rats soumis au régime cafétéria. *Ann Cardiol Angeiol*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ancard.2016.04.008>.

193. Metchnikoff E. (1907): Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: The prolongation of life: Optimistic studies. W. Heinemann, London: 161-183.

194. Miller J.R., Siripurkpong P., Hawes J., Majdalawieh A., Ro H.S., McLeod R.S. (2008). The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid decreases adiponectin assembly by PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent mechanisms. *Journal of Lipid Research*. 49(3): 550562.

195. Miner J.L., Cederberg C.A., Nielsen M.K., Chen X., Baile C.A. (2001) Conjugated Linoleic Acid (CLA), Body Fat, and Apoptosis. *Obesity Res* 9(2), 129-134.

196. Mir, Z., Rushfeldt, M. L., Mir, P. S., Paterson, L. J., & Weselake, R. J. (2000). Effect of dietary supplementation with either conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid rich oil on the CLA content of lamb tissues. *Small Ruminant Research*, 36, 25–31.

197. Miranda, J., Arias, N., Fernández-Quintela, A., del Puy Portillo, M. (2014). Are conjugated linolenic acid isomers an alternative to conjugated linoleic acid isomers in obesity prevention?. *Endocrinol Nutr.* 2014;61(4):209--219

198. Mizock B.A. (2015). Probiotics. *Dis Mon.* 61: 259–290.

199. Moon, H., Lee, H., Seo, J., Chung, C., Kim, T., Choi, Y., & Cho, C. (2009). Antiobesity effect of PEGylated conjugated linoleic acid on high-fat diet-induced obese C57BL/6J (ob/ob) mice: Attenuation of insulin resistance and enhancement of antioxidant defenses. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(3), 187–194.

200. Moon H.S. (2015). Biological effects of conjugated linoleic acid on obesity-related cancers. *Chemico-Biological Interactions* 224 : 189–195

201. Montezano A.C., Touyz R.M. (2012). Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 110 (1):87-94.

202. Moratalla A, Gómez-Hurtado I, Moya-Pérez Á, Zapater P, Peiró G, González-Navajas JM, Gómez Del Pulgar EM, Such J, Sanz Y, Francés R. (2015). Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrhosis. *Eur J Nutr.* 2015 Feb 6.

-N-

203. Nalabolu M.R., Palasamudram K., Jamil K. (2014). Adiponectin and Leptin Molecular Actions and Clinical Significance in Breast Cancer. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 8:31–40.

204. Nakamura Y.K., Omaye S.T. (2009). Conjugated linoleic acid isomers' roles in the regulation of PPAR-gamma and NF-kappaB DNA binding and subsequent expression of antioxidant enzymes in human umbilical vein endothelial cells. *Nutrition.* 25 (7-8):800-11.

205. Nakanishi T., Oikawa D., Koutoku T., Hirakawa H., Kido Y., Tachibana T., Furuse M. (2004) Gamma-linolenic acid prevents conjugated linoleic acid-induced fatty liver in mice. *Nutrition.* 20 : 390–393.

206. Nano J., Muka T., Cepeda M., Voortman T., Dhana K., Brahimaj A., Dehghan A., Franco O.H. (2016). Association of circulating total bilirubin with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis of observational evidence. *Diabetes Metab.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2016.06.002>.

207. Nigro E., Scudiero O., Monaco M.L., Palmieri A., Mazzarella G., Costagliola C., Bianco A., Daniele A. (2014). New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. *BioMed Research International.* 658913. doi: 10.1155/2014/658913.

208. Norris, L. E., Collene, A. L., Asp, M. L., Hsu, J. C., Liu, L. F., Richardson, J. R., Li, D., Bell, D., Osei, K., Jackson, R. D., & Belury, M. A. (2009). Comparison of dietary conjugated linoleic acid with safflower oil on body composition in obese postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(3), 468–476.

-O-

209. Ohnuki K., Haramizu S., Oki K., Ishihara K., Fushiki T. (2001). A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. *Lipids.* 36 (6) : 583-587.

210. Organisation Mondiale de la Santé (1999). Report of a WHO consultation : definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I : Diagnosis and classification of diabetes mellitus. 20- 21.

211. Organisation Mondiale de la Santé (2014). Organisation mondiale de la santé. Obesity and inequities. Guidance for addressing inequities in overweight and obesity. ISBN 978 92 890 5048 7.

212. Onakpoya U.U., Adewole O., Ogunrombi A.B., Adenekan A.T. (2012). Oxygen Supplementation during Awake Fiberoptic Bronchoscopy in a Nigerian Tertiary Hospital. *West African Journal of Medicine.* 31(4): 238-242.

213. Onakpoya I., Posadzki P., Watson L., Davies L., & Ernst E. (2012). The efficacy of long-term conjugated linoleic acid (CLA) supplementation on body composition in overweight and obese individuals: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *European Journal of Nutrition*, 51, 127-134.
214. O'Shea E.F., Cotter P.D., Stanton C., Ross R. P., Hill C. (2012). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 152: 189–205.
215. Ostrowska E, Suster D, Muralitharan M, Cross R.F., Leury B.J., Bauman D.E., Dunshea F.R. (2003). Conjugated linoleic acid decreases fat accretion in pigs: evaluation by dual-energy X-ray absorptiometry. *Br J Nutr* 89(2), 219-229.
216. Özer C.O., Kılıç B., Kılıç G.B. (2016). In-vitro microbial production of conjugated linoleic acid by probiotic *L. plantarum* strains: Utilization as a functional starter culture in sucuk fermentation. *Meat Sci.* 114: 24-31.
- P-**
217. Pariza M.W., Hargraves M.A. (1985). A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. *Carcinogenesis*. 6:591—3
218. Pariza M.W., Park Y., Cook M.E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* 40:283-298.
219. Parlee S.D., Lentz S.I., Mori H., MacDougald O.A. (2014). Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. *Methods Enzymol.* 537: 93-122.
220. Park Y., Albright K. L., Liu W., Storkson J. M., Cook M. E. & Pariza M. W. (1997). Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, 32, 853–858.
221. Park H.S., Ryu J.H., Ha Y.L., Park J.H. (2001). Dietary conjugated linoleic acid (CLA) induces apoptosis of colonic mucosa in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats: a possible mechanism of the anticarcinogenic effect by CLA. *Br J Nutr.* 86(5), 549-555.
222. Park, Y., Pariza, M. W. (2001). Lipoxygenase inhibitors inhibit heparin-releasable lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes and enhance body fat reduction in mice by conjugated linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1534(1), 27–33.
223. Park Y. (2009). Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad trans fat? *Journal of Food Composition and Analysis*. 22 : 388–393.
224. Patel S., Shukla R. Goyal, A. (2015). Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. *Journal of Functional Foods*, (14): 549-561
225. Park S., Bae G.H. (2015). Probiotics for weight loss: a systematic review and meta-analysis. *Nutr Res.* 35(7): 566-75.
226. Penedo, L. A., Nunes, J. C., Gama, M. A. S., Leite, P. E. C., Quirico- Santos, T. F., & Torres, A. G. (2013). Intake of butter naturally enriched with cis9,trans11 conjugated linoleic acid reduces systemic inflammatory mediators in healthy young adults. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(12), 2144–2151.
227. Pessin J.E., Kwon H. (2012). How does high-fat diet induce adipose tissue fibrosis?. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research* .60:1147-50.
228. Philippaerts, A., Goossens, S., Jacobs, P.A. & Sels, B.F. (2011): Catalytic production of conjugated fatty acids and oils. *Chem. Sus. Chem.*, 4, 684-702.
229. Palmquist D.L., Lock A.L., Shingfield K.J., Bauman D.E. (2005). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Adv Food Nutr Res.* 50:179-217.

230. Peterson K.M., O'Shea M., Stam W., Mohede I.C., Patrie J.T., Hayden F.G. (2009). Effects of dietary supplementation with conjugated linoleic acid on experimental human rhinovirus infection and illness. *Antivir Ther.* 14 (1):33-43.

231. Poulos S. P., Sisk M., Hausman D. B., Azain M. J., Hausman G. J. (2001). Pre- and postnatal dietary conjugated linoleic acid alters adipose development, body weight gain and body composition in Sprague-Dawley rats. *J. Nutr.* 131:2722-2731.

232. Puniya A.K., Chaitanya S., Tyagi A.K., De S. & Singh, K. (2009). Conjugated linoleic acid producing potential of lactobacilli isolated from the rumen of cattle. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 11, 1223-8

233. Purushotham A., Shrode G.E., Wendel A.A., Liu L.F., Belury M.A. (2007). Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 18: 676– 684.

-Q-

234. Qiao, Y., Sun, J., Xia, S., Li, L., Wang, P., Shi, Y., Le, G. (2015). Effects of different *Lactobacillus reuteri* on inflammatory and fat storage in high-fat diet-induced obesity mice model. *Journal of functional foods* 14 : 424–434.

235. Quirino, R.L. & Larock, R.C. (2012): Rh-based biphasic isomerization of carbon-carbon double bonds in natural oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 89, 1113–1124.

-R-

236. Racine, N. M., Watras, A. C., Carrel, A. L., Allen, D. B., McVean, J. J., Clark, R. R., O'Brien, A. R., O'Shea, M., Scott, C. E., & Schoeller, D. A. (2010). Effect of conjugated linoleic acid on body fat accretion in overweight or obese children. *American Journal of Clinical Nutrition*, 91(5), 1157–1164.

237. Rahman SM, Wang Y, Yotsumoto H, et al. (2001) Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and beta-oxidation of fatty acid in OLETF rats. *Nutrition* 17(5), 385-390.

238. Rahman S.A., Adjero D. (2015). Surface-Based Body Shape Index and Its Relationship with AllCauseMortality. *PloS One* 10, e0144639.

239. Rakib M. A., Lee W. S., Kim G. S., Han J. H., Kim J. O., Ha Y. L. (2013). Antiproliferative action of conjugated linoleic acid on human MCF-7 breast cancer cells mediated by enhancement of gap junctional intercellular communication through inactivation of NF-κB. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2013, 12.

240. Ranadheera S.C., Evans A., Adams M. (2014). Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. *Journal of Functional Food.* (8): 18-25.

241. Ridaura V.K., Faith J.J., Rey F.E., et al. (2013). Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science.* 341:1241214.

242. Riestra P., Gebreab S. Y., Xu R., Khan R. J., Bidulescu A., Correa A., et al. (2015). Gender-specific associations between ADIPOQ gene polymorphisms and adiponectin levels and obesity in the Jackson Heart Study cohort. *BMC Med. Genet.* 16:65 10.1186/s12881-015-0214-x.

243. Ringo, E., Bendiksen, H.R., Gausen, S.J., Sundsfjord, A. and Olsen, R.E. (1998) The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *J Appl Microbiol* 85, 855-864.

244. Riserus U, Arner P, Brismar K, Vessby B (2002) Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 25(9), 1516-1521.

245. Rodríguez-Alcalá LM, Braga T, Xavier Malcata F, Gomes A, Fontecha J.(2011). Quantitative and qualitative determination of CLA produced by Bifidobacterium and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag +HPLC techniques. *Food Chemistry*.;125(4):1373-8.
246. Romero-Sarmiento, Y., Soto-Rodriguez, I., Arzaba-Villalba, A., Garcia, H. S., & Alexander-Aguilera, A. (2012). Effects of conjugated linoleic acid on oxidative stress in rats with sucrose-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 219–225.
247. Rosberg-Cody, E., Stanton, C., O'Mahony, L., Wall, R., Shanahan, F., Quigley, E. M., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2011). Recombinant lactobacilli expressing linoleic acid isomerase can modulate the fatty acid composition of host adipose tissue in mice. *Microbiology-SGM*, 157, 609–615.
248. Rose D. P. (1997). Effects of dietary fatty acids on breast and prostate cancers: evidence from in vitro experiments and animal studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 1513–1522.
249. Rosenbaum, M., Knight, R., and Leibel, R.L. (2015). The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 26, 493–501.
250. Rosenwald, M., Wolfrum, C. (2014). The origin and definition of brite versus white and classical brown adipocytes. *Adipocyte*. 3 (1): 4- 9.
251. Rosenow A., Noben J.P., Bouwman F.G., et al. (2013). Hypoxia-mimetic effects in the secretome of human preadipocytes and adipocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1834(12): 2761-2771.
252. Rossi E., Della Casa L., Piana S., Iannone A. (2012) Conjugated linoleic acid isomers modulate protein expression profile in rat hepatocytes. *Genes and Nutrition*. 7: 511–527.
253. Rubio, R., Jofré, A., Martín, B. Aymerich, T., Garriga, M. (2014). Characterisation of human lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Journal of Microbiology*. 38 (1):303-311.
254. Rubin, D., Herrmann, J., Much, D., Pfeuffer, M., Laue, C., Winkler, P., Helwig, U., Bell, D., Auinger, A., Darabaneanu, S., Ruether, A., & Schrezenmeir, J. (2012). Influence of different CLA isomers on insulin resistance and adipocytokines in pre-diabetic, middle-aged men with PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism. *Genes and Nutrition*, 7(4), 499–509.
- S-
255. Salamon, R.V., Lóki, K., Csapó-Kiss, Zs., Salamon, Sz. & Csapó, J. (2014). Synthetic methods to obtain conjugated linoleic acids (CLAs) by catalysis – A review. *ACTA ALIMENTARIA*. DOI: 10.1556/AAlim.2014.0006 .
256. Santos-Zago L. F., Botelho A. P., de Oliveira A. C. (2007). Supplementation with commercial mixtures of conjugated linoleic acid in association with vitamin E and the process of lipid autoxidation in rats. *Lipids*. 42 : 845–854.
257. Sanyal A., Naumann J., Hoffmann L.S., Chabowska-Kita A., Ehrlund A., Schlitzer A., Arner P., Blüher M., Pfeifer A. (2017). Interplay between Obesity-Induced Inflammation and cGMP Signaling in White Adipose Tissue. *Cell reports*, 18 (1): 225–236. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.028>.
258. Sosa-Castañeda J., Hernández-Mendoza A., Astiazarán-García H., Garcia H.S., Estrada-Montoya M.C., González-Córdova A.F. Vallejo-Cordoba B. (2015). Screening of Lactobacillus strains for their ability to produce conjugated linoleic acid in milk and to adhere to the intestinal tract. *J Dairy Sci*.98: (10):6651-9.
259. Schlienger J.L., Monnier L. (2016). Le syndrome métabolique a déjà une histoire. *Médecine des Maladies Métaboliques*. 10 (1): 75–80. [http://dx.doi.org/10.1016/S1957-2557\(16\)30022-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1957-2557(16)30022-0).
260. Smedman A., Vessby B. (2001). Conjugated linoleic acid supplementation in humans--metabolic effects. *Lipids*. 36 (8): 773-81.

261. Serban D.E. (2014). Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota. Probiotics and Prebiotics. 345: 258-270
262. Seki, K., Kaneko, R. & Kobayashi, K. (1998): Photoconjugation of methyl linoleate in the presence of iodine as a sensitizer. *Yukagaku*, 38, 949-954.
263. Sharma, P., Tomar, S.K., et Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research international*. 60 :176-195
264. Shen W., McIntosh M.K. (2016). Nutrient Regulation: Conjugated Linoleic Acid's Inflammatory and Browning Properties in Adipose Tissue. *Annu Rev Nutr*. 17 (36): 183-210.
265. Shin N. R., Lee J. C., Lee H. Y., Kim M. S., Whon T. W., Lee M. S. & Bae J. W.(2014).An increase in the Akkermansia spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*, 63, 727-35.
266. Shin J.S, Peng L., Kang K., Choi Y. (2016). Direct analysis of prostaglandin-E2 and -D2 produced in an inflammatory cell reaction and its application for activity screening and potency evaluation using turbulent flow chromatography liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.08.020>.
267. . Song, Y., Kang,S. Oh, D., (2005). Biocoverison of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Bifidobacterium breve*. *Biotechnology and bio process engineering*. 10: 357-361
268. Song H., Wu T., Xu D., Chu Q., Lin D., Zheng X. (2016) Dietary sweet cherry anthocyanins attenuates diet-induced hepatic steatosis by improving hepatic lipid metabolism in mice, *Nutrition*. doi: 10.1016/j.nut.2016.01.007.
269. Sornplang P., Piyadeatsoontorn S. (2016). Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *J.Anim. Sci. Technol*. 58, 26.
270. Stachowska E., Baskiewicz M., Marchlewicz M., Czuprynska K., Kaczmarczyk M., Wiszniewska B., Machalinski B., Chlubek D. (2010). Conjugated linoleic acids regulate triacylglycerol and cholesterol concentrations in macrophages/foam cells by the modulation of CD36 expression. *Acta Biochim. Pol.* 57/ 379–384.
271. Stachowska E., Dziedziejko V., Safranow K., Gutowska I., Adler G., Ciechanowicz A., Machalinski B., Chlubek D. (2007). Inhibition of phospholipase A2 activity by conjugated linoleic acids in human macrophages. *Eur J Nutr*. 46 (28) : –33 229.
272. Stangl GI, Muller H, Kirchgessner M (1999). Conjugated linoleic acid effects on circulating hormones, metabolites and lipoproteins, and its proportion in fasting serum and erythrocyte membranes of swine. *Eur J Nutr* 38(6), 271-277.
273. Stangl G. (2000). High dietary levels of a conjugated linoleic acid mixture alter hepatic glycerophospholipid-carrying serum lipoproteins of rats. *J. Nutr. Biochem*. 11:184-191.
274. Stringer D.M., Zahradka P., DeClercq V.C., Ryz N.R., Diakiw R., Burr L.L., Xie X., Taylor C.G. (2010). Modulation of lipid droplet size and lipid droplet proteins by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid parallels improvements in hepatic steatosis in obese, insulin-resistant rats. *Biochimica et Biophysica Acta*.1801 : 1375–1385
275. Sugano M.,Tsujita A., Yamasaki M., Noguchi M., Yamada K. (1998). Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats.*Lipids*. 33 : 521–527.
276. Sun, K., Tordjman, J., Clément, K., and Scherer, P.E. (2013). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab*. 18: 470–477.
277. Surmacz E. (2013). Leptin and adiponectin: emerging therapeutic targets in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 18, 321–332. 10.1007/s10911-013-9302-8

-T-

278. Talpur A.D., Munir M.B., Anna M., Hashim R. (2014). Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. *Aquaculture*.426 (427):14–20.
279. Tang R.B. Chang J.K., Chen H .L. (2015). Can probiotics be used to treat allergic diseases. *The chinese Medical Association*, 78:154-157.
280. Tordjman J., Divoux A., Prifti E., Poitou C., Pelloux V., Hugol D., Basdevant A., Bouillot J.L., Chevallier J.M., Bedossa P., Guerre-Millo M., Clement K. (2012). Structural and inflammatory heterogeneity in subcutaneous adipose tissue: relation with liver histopathology in morbid obesity. *J Hepatol*. 56 (5):1152-8.
281. Trayhurn P. (2014). Hypoxia and adipocyte physiology: implications for adipose tissue dysfunction in obesity. *Annu Rev Nutr*. 34: 207-236
282. Tripathi, M.K. et Giri, S.K. (2014). Probiotics functional Foods: Survival of probiotics during Processing and Storage. *Fonctional Food*. 58: 225-241.
283. Tsuboyama-Kasaoka N., Takahashi M., Tanemura K., Kim H-J., Tange T., Okuyama H., Kasai M., Ikemoto S., Ezaki O. (2000). Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49: 1534–1542.
284. Tsuboyama-Kasaoka N., Miyazaki H., Kasaoka S., Ezaki O. (2003). Increasing the amount of fat in a conjugated linoleic acid-supplemented diet reduces lipodystrophy in mice. *J Nutr*. 133: 1793–1799
385. Turpeinen A.M., Ylonen N., von Willebrand E., Basu S., Aro A. (2008). Immunological and metabolic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in subjects with birch pollen allergy. *Br J Nutr*. 100:112–119.

- V-

286. Vague J. (1947). La différenciation sexuelle, facteur déterminant des formes de l'obésité. *Presse Méd*, 30, 339-340.
287. Valenti L., Riso P., Mazzocchi A., Porrini M., Fargion S., Agostoni C. (2013). Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic Fatty liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 145- 421.
288. Vanderplas Y., Hys G., Daube G. (2015) .Probiotics informacoes atualizadaz. *Journal of pediatrics*, (1):6-21
289. Van Nieuwenhove CP, Gauffin Cano P, Pérez-Chaia AB, González SN. (2011). Effect of functional buffalo cheese on fatty acid profile and oxidative status of liver and intestine of mice. *Journal of Medicinal Food*. 14(4):420-7.
290. Van Nieuwenhove, C.P., Terán, V., González, S.N. (2012). Conjugated Linoleic and Linolenic Acid Production by Bacteria: Development of Functional Foods. Chapter 3. ISBN 978-953-51-0776-7.
291. Varady J., Gessner D.K., Most E., Eder K., Ringseis R. (2011). Dietary moderately oxidized oil activates the Nrf2 signaling pathway in the liver of pigs. *Lipids Health Dis*.11:31–40
292. Vela Gurovic , M.S., Gentili, A.R., Olivera, N.L., Rodríguez, M.S. (2014). Lactic acid bacteria isolated from fish gut produce conjugated linoleic acid without the addition of exogenous substrate. *Process Biochemistry* . 49 : 1071–1077.
293. Vatier C, Poitou C, Clément K. (2014). Evaluation of visceral fat in massive obesity. In: Watson RR, editor. *Nutrition in the prevention and treatment of abdominal obesity*. Elsevier. 68–73.
294. Vergin F. (1954). Anti- and probiotika. *Hippokrates*. 25: 16–19.
295. Viladomiu M., Hontecillas R., Bassaganya-Riera J. (2015). Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *European Journal of Pharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.095i>

296. Vincent J.L., Russell J., Jacob M., Martin G., Guidet B., Wernerman J., Ferrer Roca R., McCluskey S., Gattinoni L. (2014). Albumin administration in the acutely ill: what's new and where next?. *Crit Care*. 18: 231-10.

297. Vyas D., Kadegowda A.K., Erdman R.A. (2012). Dietary conjugated linoleic Acid and hepatic steatosis: species-specific effects on liver and adipose lipid metabolism and gene expression. *Journal of Nutrition and Metabolism*. 2012:932928

-W-

298. Wall R., Ross R. P., Shanahan F. L., O'Mahony C., O'Mahony M., Coakley O., Hart P., Lawlor E. M., Quigley B. & other authors. (2009). Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *American Journal of Clinical Nutrition*. 89: 1393–1401.

299. Wallace R. J., McKain N., Shingfield K. J., Devillard, E. (2007). Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *J Lipid Res*. 48: 2247– 2254.

300. Wang X.A., Deng S., Jiang D., Zhang R., Zhang S., Zhong J., et al. (2013). CARD3 deficiency exacerbates 363 diet-induced obesity, hepatosteatosis, and insulin resistance in male mice. *Endocrinology*. 364 (154):685-97.

301. West DB, Delany JP, Camet PM, Blohm F, Truett AA, Scimeca J (1998) Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am J Physiol* 275(3 Pt 2), R667-72.

302. Whigham L.D., Cook M.E., Atkinson R.L. (2000). Conjugated linoleic acid: Implications for human health. *Pharmacological Research*. 42 : 503–510

303. Winer, D.A., Luck, H., Tsai, S., and Winer, S. (2016). The Intestinal Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metab*. 23, 413–426.

304. World Health Organization (1999). Report of a WHO consultation : definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part I : Diagnosis and classification of diabetes mellitus. 20-21.

305. World Health Organization (WHO). (2006). Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO). (2006) .Probiotics and Prebiotics.

306. World Health Organization (2014). Obesity and overweight. Fact sheet no. 311. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.

307. Whigham L.D., Watras A.C., Schoeller D.A. (2007). Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*. 85(5): 1203-1211.

-X-

308. Xu S, Boylston TD, Glatz BA. (2004). Effect of lipid source on probiotic bacteria and conjugated linoleic acid formation in milk model systems. *J Am Oil Chem Soc* 81:589-95.

309. Xu P., Hong F., Wang J., Cong Y., Dai S., Wang S., Wang J., Jin X., Wang F., Liu J. (2017). Microbiome remodeling via the montmorillonite adsorption-excretion axis prevents obesity-related metabolic disorders. *EBioMedicine*, doi:10.1016/j.ebiom.2017.01.019.

-Y-

310. Yahla I., Ziar H., Benali M., Riazi A. (2016). Bacterial Conjugated Linoleic Acid Effect on Hepatic and Adipose Tissues of High-Fat diet-Induced Obese Rats. *South Asian Journal of Experimental Biology*. 6 (4) : ISSN: 2230-9799.

311. Yamasaki, M., Mansho, K., Mishima, H., Kimura, G., Sasaki, M., Kasai, M., Tachibana H, Yamada K. (2000). Effect of dietary conjugated linoleic acid on lipid peroxidation and histological change in rat liver tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 : 6367–6371.

312. Yamasaki, T. Nagatomo, T. Matsuyama, Y. Ikeho, E. Kato, K. Nishiyama, Y. Sakakibara, M. Suiko, K. Nishiyama, (2012) Conjugated linoleic acids inhibit hypoxia inducible factor-1 α stabilization under hypoxic condition in human hepatocellular carcinoma cells, *J. Oleo Sci.* 61 491–496.
313. Yamasaki M., Yanagita T. (2013). Adipocyte response to conjugated linoleic acid. *Obesity Research & Clinical Practice.* 7 (4): e235-42.
314. Yang B., Chen, H., Gu, Z., Fengwei, T., Ross, R. P., Stanton, C., Chen, Y. Q., Chen, W., & Zhang, H. (2014). Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2), 430–439.
315. Yang, B., Chen, H., Stanton, C., Paul Ros, R. Zhang, H., Chen, Q., Chen, W. (2015). Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods* 15 : 314–325
316. Yang M, Cook M.E. (2003). Dietary conjugated linoleic acid decreased cachexia, macrophage tumor necrosis factor- α production, and modifies splenocyte cytokines production. *Exp Biol Med* (Maywood). 228(1): 51-8.
317. Yatsunencko T., Rey F.E., Manary M.J., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 486:222–7.
318. Yeung C. H. Y., Yang L., Huang Y., Wang J. & Chen Z. Y. (2000). Dietary conjugated linoleic acid mixture affects the activity of intestinal acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase in hamsters. *British Journal of Nutrition*, 84, 935–941.
319. Yonekura, L., H. Sun, C. Soukoulis and I. Fisk. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods* 6: 205-214. En <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.008>.
320. Yotsumoto H., Hara E., Naka S., Adlof R.O., Emken E.A. & Yanagita T. (1999). 10trans, 12cis-linoleic acid reduces apolipoprotein B secretion in HepG2 cells T. *Food Research International*, 5, 403–409.
321. Youdim KA., Deans S.G. Dietary supplementation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil during the lifetime of the rat: its effects on the antioxidant status in liver, kidney and heart tissues. (1999). *Mech Ageing Dev.* 109 (3):163-75.
322. Yu L., Adams A., Gabel M. (2002). Conjugated linoleic acid isomers differ in their free radical scavenging properties. *J. Agric. Food Chem.* 50:4135-4140.
- Z-
323. Zambell K.L., Keim N.L., Van Loan M.D., Gale B., Benito P., Kelley D.S., Nelson G.J. (2000). Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids.* 35 (7) :777-82.
324. Zayani Y., El Golli N., Zidi W., Guizani I., Boussairi S., Aloui S., Ayadi I., Ftouhi B., Feki M., Ben Romdhane N., Ben Sliman H., Allal-Elasmi M., Kaabach N. (2016). Inflammations mediators and circulating levels of matrix metalloproteinases: Biomarkers of diabetes in Tunisians metabolic syndrome patients. *Cytokine.* 86 : 47–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.07.009>.
325. Zechner R., Kienesberger P.C., Haemmerle G., Zimmermann R., Lass A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of Lipid Research.* 50: 3–21.
326. Zhang J., Wang O., Guo Y., Wang T., Wang S., Guopeng L, Ji B., & Deng, Q. (2016). Effect of Increasing Doses of Linoleic and α -Linolenic Acids on HighFructose and High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome in Rats. *Journal of agriculture and food chemistry.* DOI:10.1021/acs.jafc.5b04715.
327. Zeng W., Pirzgalska, R.M., Pereira M.M.A., Kubasova N., Barateiro A., Seixas E., Lu Y.-H., Kozlova A., Voss H., Martins G.G., Friedman J.M., Domingos A.I. (2015). Sympathetic Neuro-adipose Connections Mediate Leptin-Driven Lipolysis. *Cell* 163: 84–94.

328. Ziar H. & Riazi A. (2011). Effets des caséines et des hydrolysats protéiques laitiers sur l'assimilation invitro de cholestérol par certaines bactéries lactiques. Cahier de Nutrition et de Diététiques, 46,S85.

329. Ziar H., Gérard P. & Riazi A. (2014). Effect of prebiotic carbohydrates on growth, bile survival and cholesterol uptake abilities of dairy-related bacteria. Journal of Science Food and Agriculture, 6,1184-90.

ANNEXE

- Annexe 1

La composition des milieux de culture ci-après, est calculée pour un litre de milieu de culture. Tous les milieux préparés sont autoclavés à 121 °c /min.

Milieu MRS (De Man, Rogosa et Sharpe) (De Man et al., 1960) :

Glucose	20g
Peptone.....	10g
Extrait de viande de bœuf	8g
Acétate de sodium, 3H ₂ O	5g
Extrait de levure.....	4g
K ₂ HPPO ₄	2g
Citrate d'ammonium	2g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05g
H ₂ O	1000ml
Tween 80.....	1,0ml
PH	6.5 ±0,2

MRS Cystéiné

Glucose	20g
Peptone.....	10g
Extrait de viande de bœuf	8g
Acétate de sodium, 3H ₂ O	5g
Extrait de levure.....	4g
K ₂ HPPO ₄	2g
Citrate d'ammonium	2g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2g
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,05g
Cys HCl.....	0,5g
H ₂ O	1000ml

Tween 80.....	1,0ml
Agar	17g
PH	6.5 ±0,2

Dilution simple(DS) (Nebra et Blanch ,1999)

Peptone	1g
NaCl	8,5g
L-cystéine-HCl.....	0,5g
H ₂ O.....	1000mL
PH	7.0±0.2

Tampon PBS

NaCl.....	8g
KCl.....	0, 2g
Na ₂ HPO ₄	1, 44g
KH ₂ PO ₄	0,24g
H ₂ O.....	1000ml

BHI (Laboratorios conda S.A.) C /La forja 9 .28850Torrejon de Ardoz, Madrid.Spain.

Infusion de cœur de beuf.....	10g
Mixture de peptone.....	10g
infusion de cerveau	7,5g
Chloride de sodium.....	5g
Dissodium phosphate.....	2,5g
Dextrose.....	2g
Agar.....	15g
H ₂ O.....	1000ml
PH.....	7,4± 0,2

Communications Nationales et Internationales

Communications Internationales

- Yahla I., Boufadi Y., Ziar H., Riazi A. Effets Anti-Inflammatoire et Anti-oxydant des isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA) produits par des souches probiotiques. Communication orale au Vème congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources (BVBR), Tabarka du 22 au 25 mars 2017. Prix de la meilleure communication.

Communications Nationales

- Yahla I, Ziar H., Boufadi Y., Riazi A. Effet des Acides Linoléiques Conjugués produits par des Bactéries Probiotiques sur le Stress Oxydatif. . Communication orale aux VII èmes journées scientifiques SNV, avril 2017, Mostaganem
- Yahla I, Ziar H., Benali M., Riazi A. Effet des isomères conjugués de l'acide linoléique produits par des souches probiotiques sur les tissus hépatiques et adipeux de rats soumis à un régime hyper gras. Communication orale aux VIèmes journées scientifiques SNV, avril 2016, Mostaganem
- Yahla I, Ziar H., Riazi A., Benali M. Bioproduction of conjugated linoleic acid isomers by probiotic strains. Communication orale au 1^{er} séminaire national de biologie et santé, décembre 2015, Sidi Bel Abbas.
- Yahla I., Ziar H., Riazi A. Effet anti inflammatoire des probiotiques associées aux isomères conjugués de l'acide linoléique (CLA) chez les rats Wistar. Communication orale aux XXIème Journées Nationales de Microbiologie, Novembre 2015, Bechar.
- Yahla I, Ziar H., Riazi A., Benali M. Impact de la microencapsulation au gel mixte d'alginate de calcium et de galactomannanes sur le pouvoir hypocholestérolémiant de certaines souches lactiques bénéfiques. Communication affichée aux 1^{ères} journées scientifiques SNV, Janvier 2014, Sidi Bel Abbas.
- Yahla I., Ziar H., Riazi A. Pouvoir s'assimilation de cholestérol chez les bactéries lactiques encapsulées. Communication orale aux IVèmes journées scientifiques de la faculté SNV, avril 2013, Mostaganem.

Publications Internationales

- Yahla I., Ziar H., Benali M., Riazi A. (2016). Bacterial Conjugated Linoleic Acid Effect on Hepatic and Adipose Tissues of High-Fat diet-Induced Obese Rats. *South Asian Journal of Experimental Biology*. 6 (4) : ISSN: 2230-9799.
- Yahla I., Ziar H, Benali M., Farizon Y., Enjalbert F., Riazi A. Anti- obesity effect of probiotic bacteria producing conjugated linoleic acids on high fat diet fed rats. *European Journal of Lipid Science and Technology*. En révision (soumis).
- Yahla I., Ziar H., Boufadi Y., Benali M., Riazi A. Effect of Conjugated Linoleic Acid Produced by Probiotic Bacteria on Oxidative Stress and Obesity Induced Inflammation. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*. En préparation

**REGULAR ARTICLE**

Bacterial Conjugated Linoleic Acid Effect on Hepatic and Adipose Tissues of High-Fat diet-Induced Obese Rats

Imene Yahla^{1,2}, Hasnia Ziar¹, Mohamed Benali² and Ali Riazi^{1*}

¹Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS), Université Abdelhamid Ibn Badis, Rue Hocine Hamadou, BP 300, Mostaganem, 27000 Algeria

²Laboratoire de Biotoxicologie, Université Djillali Liabbes, Sidi-Bel-Abbes, 22000, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 6 Nov 2016

Revised: 25 Nov 2016

Accepted: 25 Nov 2016

***Corresponding Author:**

Email: ardz22003@yahoo.fr

Telephone: +213 5 50 20 43 65

Fax: +213 45 41 68 40

Keywords: Diet-induced model of obesity, Conjugated Linoleic Acid, Hepatic steatosis, Adipose tissue lipid profile

ABSTRACT

The aim of the present study is to background the effect of conjugated linoleic acid isomers (CLA) produced by two probiotic strains, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS (a human originated bacterium) and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12, on both hepatic and adipose tissues of high-fat diet fed Wistar rats. Five-week-old male Wistar rats were divided into 4 groups (n=6) fed a high-fat diet for three of them (control and supplemented with 1×10^9 CFU per rat of LBRE-LSAS or Bb12 strain and 1.4% of free linoleic acid; designed as treated rats) and a standard diet for the fourth group. After 8 weeks of experimental period, rats were sacrificed after chloroform anesthesia; livers and adipose tissues of each group were excised for biochemical and histological analyses. Obtained results showed that livers of treated high-fat diet fed rats did not exhibit a hepatic steatosis like those of untreated high-fat diet fed rats (control group) did. Lipid profile (triglycerides and total cholesterol) of the liver and the adipose tissue was markedly improved in treated rat groups, especially in LBRE-LSAS strain given high-fat diet rats. Such results strongly support the occurrence of the bacterial power of *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12 to modulate lipid metabolism and to avoid steatosis in diet-induced model of obesity in rat.

1. Introduction

Obesity is known as a metabolic nutritional disorder involving chronic energy imbalance due to the high caloric intake and reduced energy expenditure (Gao et al., 2015). Because of the established associated health complications such as atherogenic dyslipidemia, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), obesity has become a major global health challenge.

The high-fat diet-induced NAFLD begins with sim-

ple hepatic steatosis which is defined by an excessive accumulation of fat, essentially in triglyceride (TG) form within the cytoplasm of hepatocyte resulting from a complex interplay between the diet, the metabolic system, and host responses at the level of the adipose tissue, muscle, pancreas, and the liver (Matherly et Puri, 2012). Hepatic steatosis can progress to more severe non-alcoholic steatohepatitis (NASH), liver fibrosis, cirrhosis and even hepatocellular carcinoma (HCC) (Cohen et al., 2011).

Besides, fibrosis in adipose tissue is an important hallmark of adipose tissue abnormalities, which is closely related to adiposity in mice and human (Pessin et Kwon, 2012). Although adipocyte expansion is essential to fat storage accommodation, excessive and rigid extracellular matrix (ECM) surrounding adipocytes can cause local fibrosis and inflammation (Divoux et al., 2010). While metabolic consequences of adipose tissue fibrosis are not well understood, recent studies have shown that fibrosis may be a cause or a result of adipose tissue inflammation in obesity (Sun et al., 2013).

There are currently no specific guidelines and pharmacological treatments for NAFLD, thus the only established approach for NAFLD amelioration is lifestyle modification, such as, reducing body weight through healthy diet and exercise due to its strong association with metabolic syndrome and obesity (Valenti et al., 2013). Therein, some bioactive lipids such as Fatty Acids (FA) could be considered as functional food and may be important in modulating body weight and metabolism (Vyas et al., 2012). A specific group of polyunsaturated fatty acids, collectively identified as conjugated linoleic acid (CLA), has been pointed out as a potential energy metabolism regulator and is still being used commercially as a weight-loss supplement (Yang et al, 2015). Unlike ruminant, linoleic acid conversion into CLA has not any significant level in human. Therefore, the amount of CLA recommended to human in order to exert health benefits must be assured by dairy intake (Jiang et al., 1998). In fact, many recent studies showed that dairy CLA improve hepatic steatosis (Vyas et al., 2012) and reduce adipocyte volume (Hu et al., 2012).

In a previous study (data not shown), we have shown that CLA produced by two probiotic strains, *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Bb12, significantly reduces high-fat diet-induced body weight gain in Wistar rats; whereas their effect on hepatic and adipose tissues was not explored. In the present study, we hypothesized that bacterial CLA could modulate positively lipid metabolism in liver and adipose tissues; that is the main goal of this experiment.

2. Materials and Methods

2.1. Animal care and experimental design

Five-week-old male Wistar rats were purchased from Pasteur institute (Algiers, Algeria) and were

given a standard diet (Animal Food, Bouzereah, Algiers, Algeria) and tap water *ad libitum*, and housed during 2 weeks in an air-conditioned room at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and $55 \pm 10\%$ relative humidity with standard 12h-light-dark cycle. Ethical treatment of animals was assured according to the General Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations (Council of European Communities, 1986). After 2 weeks of acclimatization period of the animals, rats were divided into 4 groups (n=6) fed a high-fat diet for three of them (control and supplemented with 1×10^9 CFU per rat of LBRE-LSAS or Bb12 strain and 1.4% of free linoleic acid; designed as treated rats) and a standard diet for the fourth group. No restriction in diet and water supply was made. The experiment was run for 8 weeks in the conditions described above. This experiment was approved by the Algerian Ethics Committee for Research on Animals of Abdelhamid Ibn Badis University of Mostaganem (ECRA/AIBUM).

2.2. Diet composition

Two types of diet were used in this experiment, a high-fat diet for obesity induction and a standard diet. Based on diet calorificity supply, the high-fat diet consisted of 47.2% fat, 35.1% carbohydrates and 17.6% proteins (4.79 cal/g), whereas the standard diet contained 11% fat, 65% carbohydrates and 24% proteins (3.55 cal/g). Diet composition is reported in table 1.

Ingredients	High fat diet HFD (g/kg)	Standard diet SD (g/kg)
Casein "Vitamin-free" test	200	180
Corn Starch	167	390
DL- Methionine	3.6	3
Sucrose	100	100
Maltodextrin	140	140
Cellulose	60	50
L-Cystine	2.1	1.8
Choline Bitartrate	2.9	2.5
Mineral mix, AIN-93G-MX	42	35
Vitamin mix, AIN-93-VX	11.9	10
Fat sheep	209.4	/

Table 1: Diet composition

2.3. Animal sacrifice and sample collection

After 8 weeks of experimental period, animals were anesthetized and scarified after 12h of fasting. Liver and adipose tissues were carefully excised, rinsed in cold saline and fixed in 10% buffered neutral formalin for histological evaluation. The remaining pieces of liver and adipose tissues were used for biochemical parameters determination.

2.4. Determination of biochemical parameters

Liver and adipose tissues were crushed using an Ultra-Turrax in phosphate saline buffer (PBS) supplemented with 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) in order to determine total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) using a colorimetric method (Spinreact, Sant Esteve De Bas, Spain; Kit Biolabo, Maizy, France).

2.5. Histopathological analysis

Liver and adipose tissues from each group were fixed with 10% buffered formalin, dehydrated in an alcohol-xylene series, and embedded in paraffin wax. Thin slices of liver tissue were stained with hematoxylin and eosin (H&E) (Kiernan, 1990). Light-microscopic fields were assessed by an image analyzer (Optika, Italy).

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as means ± SEM. The statistical analysis was performed using software statbox pro. (Version 6.40, Statbox pro) and differences between the means were evaluated using one-way ANOVA. Differences between treatment means were assessed using Newman-Keuls test. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Total cholesterol and triglyceride levels in liver

Total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) levels in the liver of the different groups of rats are reported in table 2. TC and TG levels in liver of the control rats remained unchanged and ranged in the normal values. In contrast, high-fat feeding significantly increased TC and TG levels in liver by approximately 54% and 12.8% comparatively to the standard diet. Importantly, high levels of TC and TG in liver induced by HFD were significantly ($p < 0.05$) reduced in a rate of 11.9% and 15.6% for TC of Bb12 CLA and LBRE-LSAS CLA group rats, and rate of 16.5%

Rat Groups	TG	TC
Group 1: Lactobacillus rhamnosus LBRE-LSAS produced CLA	1.28±0.01 ^f	1.13±0.01 ^c
Group 2: Bifidobacterium animalis subsp lactis Bb12 produced CLA	1.31±0.01 ^d	1.18±0.01 ^b
Group 3 : HFD control	1.57±0.01 ^a	1.34±0.01 ^a
Group 4: Standard control	1.48±0.01 ^b	0.87±0.01 ^e

Table 2: Liver TG* and TC* levels (mM/g).

*Values are means ± SEM.

a-f Different groups in the same arrow according to Newman-Keuls test with error risk $p < 0.05$

and 18.5% for TG of Bb12 CLA and LBRE-LSAS CLA group rats, respectively.

3.2. Total cholesterol and triglyceride levels in adipose tissue

As shown in table 3, high-fat feeding clearly increased TC and TG levels in adipose tissue in a rate of 17.5% and 35.3%, respectively in comparison with the control group. An important reduction in TC and TG levels of adipose tissue was detected in CLA experimental groups ($p < 0.05$). Reduction rate of 39.6% and 42.9% was registered in TC levels of Bb12 CLA and LBRE-LSAS CLA group rats, respectively. In the same way, TG levels were reduced in a rate of 46.4% and 48.1% for the Bb12 CLA and LBRE-LSAS CLA group rats, respectively.

Rat Groups	TG	TC
Group 1: Lactobacillus rhamnosus LBRE-LSAS produced CLA	1.79±0.01 ^b	0.69±0.01 ^e
Group 2: Bifidobacterium animalis subsp lactis Bb12 produced CLA	1.85±0.01 ^f	0.73±0.01 ^d
Group 3 : HFD control	3.45±0.01 ^a	1.21±0.01 ^a
Group 4: Standard control	2.55±0.01 ^b	2.55±0.01 ^b

Table 3: Adipose tissue TG* and TC* levels (mM/g).

*Values are means ± SEM.

a-f Different groups in the same arrow according to Newman-Keuls test with error risk $p < 0.05$

3.3. Liver histopathological examination

Hematoxylin and eosin (H&E) staining of lipid deposition in the liver was performed to investigate the effect of bacterial CLA on hepatic steatosis. As shown in figure 1, the livers of HFD-fed rats were characterized by lipid accumulation and fat degeneration (ballooning) of hepatocytes (fig.1C). Administration of bacterial CLA dramatically decreased the level of hepatic steatosis induced by HFD (fig.1 A and B).

3.4. Adipose tissue histology

Obesity is proprietary at the cell biological level by an increase in the size and number of adipocytes differentiated from fibroblastic pre-adipocytes in the adipose tissue (Hu et al., 2012). Histological evaluation of adipose tissue in the present study revealed that perirenal adipocyte sizes of bacterial CLA treated rat groups (fig.2 A and B) were smaller compared to HFD group adipocytes which revealed an increase in adipocyte size as shown in figure 2 C.

4. Discussion

Under high-fat diet lifestyles, excess of lipid accu-

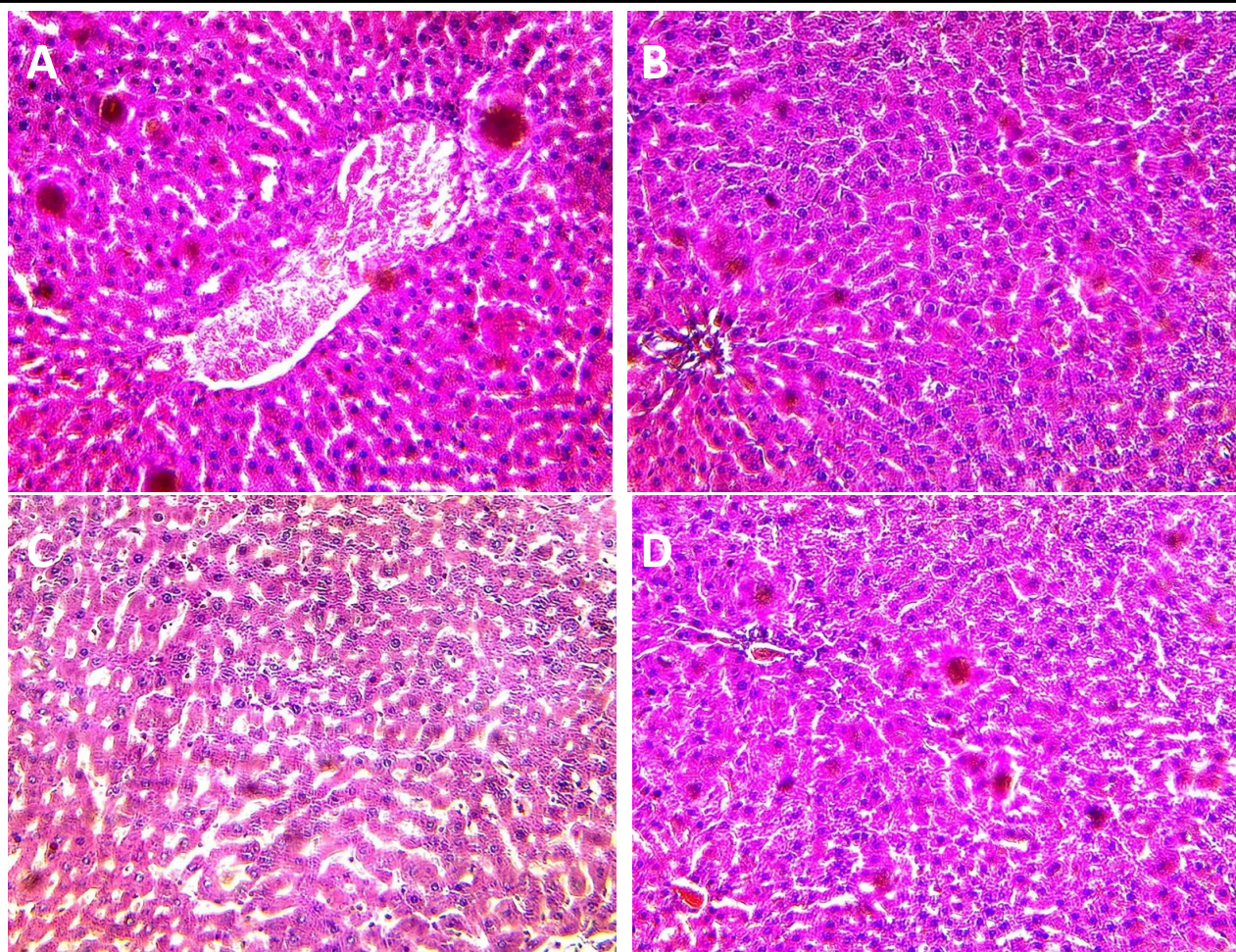


Figure 1: Histopathological analysis of hepatic tissue. Samples were stained by hematoxylin and eosin, examined in $\times 100$ light microscopy field: (A): LBRE-LSAS produced CLA group, (B): Bb12 produced CLA group, (C): HFD control group, (D), SD control group.

mulation disrupted hepatic lipid metabolism and induced liver steatosis (Wang et al., 2013). In spite of the rapidly growing comprehension of hepatic steatosis in the past decades, the exact mechanisms underlying the development of high-fat diet-induced hepatic steatosis are still not fully elucidated (Song et al., 2016). Many studies have been carried out to demonstrate that CLA profoundly reduces body fat mass in different species and also alters hepatic liver metabolism (Vyas *et al.*, 2012). The mechanism of action through which CLA may work to decrease body fat is still unclear: this represents a pivotal issue since CLA is suggested as a dietary supplement in humans (Rossi et al., 2012). In the present study we investigated the effect of probiotic produced CLA on hepatic and adipose tissues of Wistar rats fed a high fat diet. Until now, lipid droplets were considered as an inert storage pool of TG (Zechner et al., 2009). Moreover, dietary CLA isomers reduced lipid accumulation in hepatic cells, hence contributing to lipid droplet maintenance or lipolysis (Stringer et al., 2010).

The present study shows that probiotic CLA has the

ability to reduce hepatic triglyceride and total cholesterol levels. Such observations are in accordance with those reported by literature pointing out the depending variation of liver triglyceride and cholesterol levels with the animal model used. In fact, some studies have reported that CLA is ineffective in lowering cholesterol in the livers of normal mice (Ferramosca et al., 2006); whereas Kim et al. (2010) reported that CLA in esterified and free forms can effectively reduce triglyceride and cholesterol levels in the liver of obese mice. Besides, Purushotham et al. (2007) have shown that dietary CLA reduce hepatic lipid accumulation in the Wistar rat model. Recently, Malinska et al. (2015) have shown that CLA reduces ectopic lipid accumulation in the liver, myocardium, skeletal muscle, and aorta.

Increasing evidence underlines the important role of dyslipidemia-associated viscera and ectopic lipid accumulation in non-adipose tissue. It has been reported that CLA may be incorporated and have a fate similar to other fatty acids in biological systems; supplementation increased tissue CLA levels

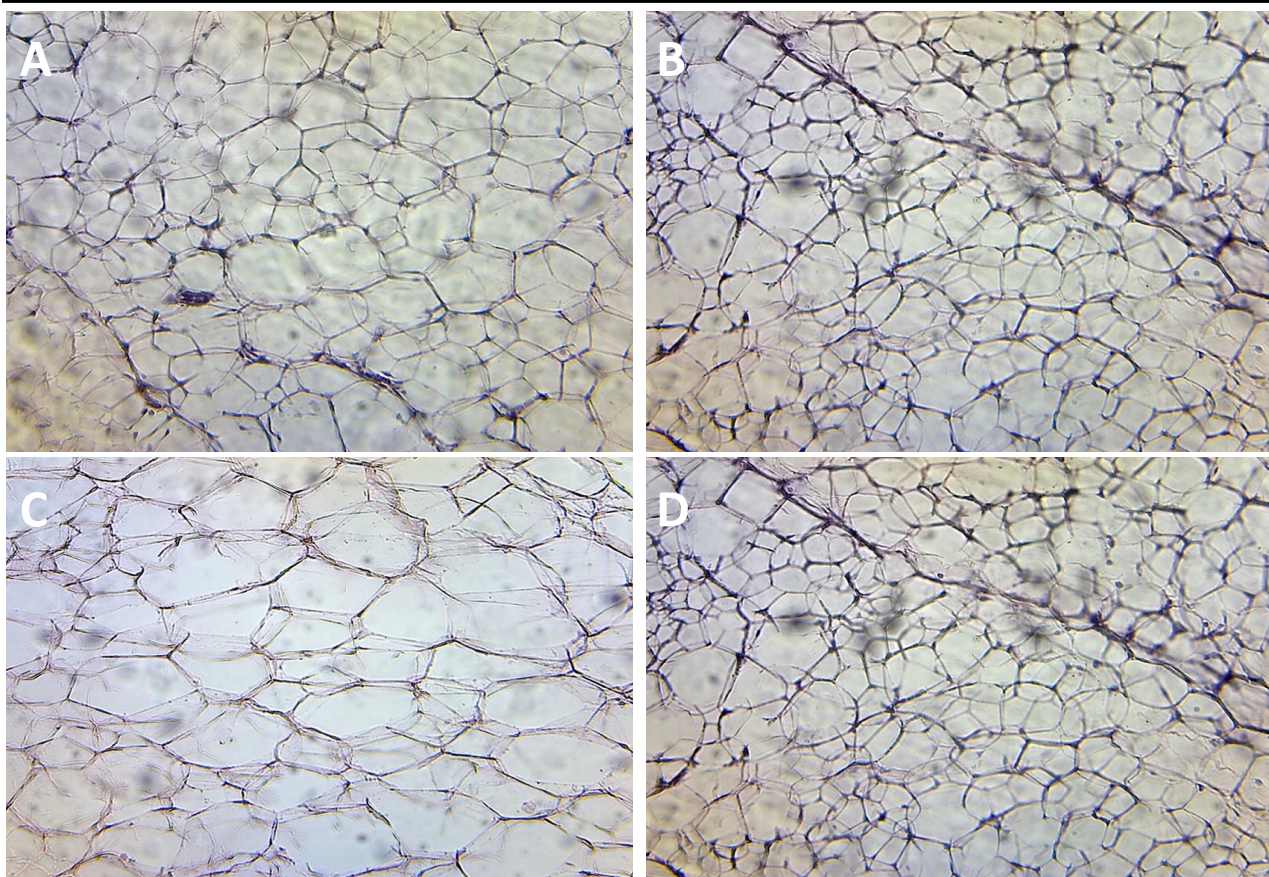


Figure 2: Histopathological analysis of adipose tissue. Samples were stained by hematoxylin and eosin, examined in $\times 100$ light microscopy field: (A): LBRE-LSAS produced CLA group, (B): Bb12 produced CLA group, (C): HFD control group, (D), SD control group.

incorporated into both phospholipid and triacylglycerol fractions (Kostogrys and Pisulewski, 2010). In contrast, many previous studies showed that CLA cause hepatic steatosis by transferring the fatty acids derived from adipose tissue into the hepatocytes, and action on genes regulating liver lipid metabolism. Besides, the noticeable reduction of serum TG can be due to a such high accumulation of fat in the liver (Rodríguez et al., 2014). It is likely that both concentration and isomer type of CLA play an important role in liver steatosis attenuation, because the adverse effect on the liver was observed predominantly with relatively higher concentration of CLA (0.5–2%) and specific isomer-type (especially t10, c12) (Lee et al., 2006).

We also investigated the effect of probiotic CLA on adipose tissue. The obtained results following probiotic CLA effect on adipose tissue investigation show that probiotic CLA reduces TC and TG levels. It seems that white adipose tissue of animal groups receiving probiotic CLA revealed a reduction in adipocyte size. This finding is in agreement with the reported results of DeClercq et al. (2010) about reduction of adipocyte cell size in t10 c12 CLA fed rats. Obesity results from both increases in the

number (hyperplasia) and size (hypertrophy) of adipocytes (Couillard et al., 2000). While previous studies have focused on the effects of dairy CLA on adipocyte properties in the context of weight gain in vivo (Yamasaki et Yanagita, 2013), there is a lack in literature regarding the effect of probiotic produced CLA on adipose tissue. CLA gained much more attention because of its reported beneficial effects on body weight and visceral adipose tissue fat deposition (Onakpoya et al., 2012). In the present study, we also observed a reduction in body weight which could be related to the decrease in fat accumulation in visceral adipose tissue (data not shown).

CLA has been reported to influence adipogenesis. Both mixture of c9-t11 CLA and t10-c12 CLA, the most biologically active isomers, and t10-c12 CLA alone, induce adiposity and lipid accumulation reduction (Whigham et al., 2007), although the effectiveness in human remain questionable (Onakpoya et al. 2012). t10-c12 CLA exhibits the greatest anti-obesity effect (Miller et al. 2008).

5. Conclusion

In conclusion, this study have shown that probiotic

produced CLA has the ability to decrease hepatic steatosis and to normalize adipocyte size in white adipose tissue in high-fat diet fed Wistar rats.

Acknowledgements

This work was funded by a grant from the Algerian ministry of higher education.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH (2011) Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332:1519-23.
- Couillard C, Mauriege P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP (2000) Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose tissue hyperplasia. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 24(6): 782-788.
- Council of European Communities (1986) Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations. *Official journal of the European Communities*. (JO 86/609/CEE) 358: 1-28.
- DeClercq V, Zahradka P, Taylor GC (2010) Dietary t10,c12-CLA but not c9, t11 CLA reduces adipocyte size in the absence of changes in the adipose renin-angiotensin system in fa/fa Zucker rats. *Lipids* 45 (11): 1025-1033.
- Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, et al. (2010). Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* 59: 2817-25.
- Ferramosca A, Savy V, Conte L, et al (2006) Conjugated linoleic acid and hepatic lipogenesis in mouse: role of the mitochondrial citrate carrier. *Journal of Lipid Research* 47: 1994-2003.
- Gao Q, Jia Y, Yang G, Zhang X, Boddu PC, Petersen B, Narsingam S, Zhu YJ, Thimmapaya B, Kanwar YS, Reddy JK (2015) PPAR α -deficient ob/ob obese mice become more obese and manifest severe hepatic steatosis due to decreased fatty acid oxidation. *American Journal of Pathology* 185 (5) : 1396-1408.
- Hu X, Li Y, Li C, Fu Y, Cai F, Chen Q, Li D (2012) Combination of fucoxanthin and conjugated linoleic acid attenuates body weight gain and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced obese rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 519(1): 59-65.
- Jiang J, Bjorck L, Fonde´n R (1998) Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. *Journal of Applied Microbiology* 85: 95 - 102.
- Kiernan JA (1990) *Histological and Histochemical Methods: theory and practice*. Pergamon Press, New York.
- Kim JH, Pan JH, Park HG, Yoon HG, Kwon OJ, Kim TW, Shin DH, Kim YJ (2010) Functional comparison of esterified and free forms of conjugated linoleic acid in high-fat-diet-induced obese C57BL/6J mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:11441-11447.
- Kostogrysb RB, Pisulewski PM (2010) Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on lipid profile and liver histology in laboratory rats fed high-fructose diet. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30: 245-250.
- Lee HY, Park JH, Seo SH, Baek MW, Kim DJ, Lee KE, Paek K S, Lee Y, Park JH (2006) Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761: 736-744
- Malinska H, Huttel M, Oliyarnyk O, Bratova M, Kazdova L (2015) Conjugated linoleic acid reduces visceral and ectopic lipid accumulation and insulin resistance in chronic severe hypertriglycerolemia. *Nutrition* 31: 1045-1051
- Matherly SC and Puri P (2012) Mechanisms of Simple Hepatic Steatosis: Not So Simple After All. *Clinical Liver Disease* 16: 505-524.
- Miller JR, Siripurkpong P, Hawes J, Majdalawieh A, Ro HS, McLeod RS (2008) The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid decreases adiponectin assembly by PPAR γ -dependent and PPAR γ -independent mechanisms. *Journal of Lipid Research* 49(3): 550-562.
- Onakpoya UU, Adewole O, Ogunrombi AB, Adenekan AT (2012) Oxygen Supplementation during Awake Fiberoptic Bronchoscopy in a Nigerian Tertiary Hospital. *West African Journal of Medicine* 31(4): 238-242.
- Pessin JE, Kwon H (2012) How does high-fat diet induce adipose tissue fibrosis? *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research* 60:1147-50.
- Purushotham A, Shrode GE, Wendel AA, Liu LF, Belury MA (2007) Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 18: 676- 684.
- Rodrigues R, Soares J, Garcia H, Nascimento C, Medeiros M, Bomfim M, Medeiros MC, Queiroga R (2014) Goat Milk Fat Naturally Enriched with Conjugated Linoleic Acid Increased Lipoproteins and Reduced Triacylglycerol in Rats. *Molecules* 19: 3820-3831.
- Rossi E, Della Casa L, Piana S, Iannone A (2012) Conjugated linoleic acid isomers modulate protein expression profile in rat hepatocytes. *Genes and Nutrition* 7: 511-527.
- Song H, Wu T, Xu D, Chu Q, Lin D, Zheng X (2016) Dietary sweet cherry anthocyanins attenuates diet-induced hepatic steatosis by improving hepatic lipid metabolism in mice, *Nutrition* doi: 10.1016/j.nut.2016.01.007.
- Stringer DM, Zahradka P, DeClercq VC, Ryz NR, Diakiw R, Burr LL, Xie X, Taylor CG (2010) Modulation of lipid droplet size and lipid droplet proteins by trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid parallels improvements in hepatic steatosis in obese, insulin-resistant rats. *Biochimica et Biophysica Acta* 1801 : 1375-1385
- Sun K, Tordjman J, Clement K, Scherer PE (2013) Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metabolism* 18:470-7.
- Valenti L, Riso P, Mazzocchi A, Porrini M, Fargion S, Agostoni C (2013) Dietary anthocyanins as nutritional therapy for nonalcoholic Fatty liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 145421.
- Vyas D, Kadegowda AK, Erdman RA (2012) Dietary conjugated linoleic Acid and hepatic steatosis: species-specific effects on liver and adipose lipid metabolism and gene expression. *Journal of Nutrition and Metabolism* 2012: 932928.
- Yamasaki M, Yanagita T (2013) Adipocyte response to conjugated linoleic acid. *Obesity Research & Clinical Practice* 7 (4): e235-42.

Yang B, Chen H, Stanton C, Ross P, Zhang H, Chen YQ, Che W (2015) Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods* 15: 314-325.

Wang XA, Deng S, Jiang D, Zhang R, Zhang S, Zhong J, et al (2013) CARD3 deficiency exacerbates diet-induced obesity, hepato-steatosis, and insulin resistance in male mice. *Endocrinology*. 364 (154):685-97.

Whigham LD, Watras AC, Schoeller DA (2007) Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 85 (5): 1203-1211.

Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R, Lass A (2009) Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *Journal of Lipid Research* 50: 3-21.
